

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



TESIS DOCTORAL

**Uso de electrones acelerados para aumentar la vida útil de lomo de
cerdo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Irene García Márquez

Directores

**Juan Antonio Ordóñez Pereda
María Isabel Cambero Rodríguez
María Concepción Cabeza Briales**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

**Uso de electrones acelerados para aumentar la vida útil de
lomo de cerdo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene García Márquez

Directores

Juan Antonio Ordóñez Pereda
María Isabel Cambero Rodríguez
María Concepción Cabeza Briales

Madrid, 2015



Departamento de Nutrición , Bromatología y Tecnología de los
Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

JUAN ANTONIO ORDÓÑEZ PEREDA, catedrático de Tecnología de los Alimentos, MARÍA ISABEL CAMBERO RODRÍGUEZ, profesora titular de Tecnología de los Alimentos y MARÍA CONCEPCIÓN CABEZA BRIALES profesora ayudante doctor de Tecnología de los Alimentos, los tres profesores del Departamento *ut supra*,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Uso de electrones acelerados para aumentar la vida útil de lomo de cerdo”**, presentada por la licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Irene García Márquez para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal que se nombre a tal fin,

y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente escrito en Madrid, a 22 de octubre de 2015.

Juan Antonio Ordóñez Pereda

María Isabel Cambero Rodríguez

María Concepción Cabeza Briales



Departamento de Nutrición , Bromatología y Tecnología de los
Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, excepto el que se refiere a la caracterización lipídica, que se hizo en el Departamento de Caracterización y Calidad de Lípidos del Instituto de la Grasa de Sevilla perteneciente a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), financiados por los proyectos de investigación:

Investigaciones en la Facultad de Veterinaria (UCM):

- AGL-2007-65235-CO2-02. Uso de radiaciones beta y pulsos de luz de alta intensidad para garantizar la seguridad microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE). Ministerio de Educación y Ciencia.
- Programa Consolider-Ingenio 2010. CSD 2007-00016. Productos cárnicos para el Siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables. Ministerio de Educación y Ciencia.
- Universidad Complutense y Comunidad de Madrid. Grupo de Investigación “920276 “Tecnología de Alimentos de Origen Animal”.

Investigaciones en el Instituto de la Grasa (CSIC):

- PO8-AGR-03498. Estudio de la evolución de la fracción de compuestos volátiles producidos en el tejido adiposo subcutáneo del jamón ibérico durante el proceso de curación. Junta de Andalucía.
- AGL-2007-65235-CO2-02. Uso de radiaciones beta y pulsos de luz de alta intensidad para garantizar la seguridad microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE). Ministerio de Educación y Ciencia.

Durante la realización de la presente Tesis, su autora fue beneficiaria de una beca F.P.I. (Formación de Personal Investigador) del Ministerio de Educación y Ciencia, con referencia BES-2008-008078 asociada al proyecto AGL2007-65235-C02-02.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento

A la profesora M^a Dolores Selgas Cortecero, directora del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante el periodo de realización de esta tesis, por su amabilidad durante estos años.

Al profesor, Lorenzo de la Hoz Perales, investigador principal del proyecto AGL2007-65235-C02-02/ALI, por seleccionarme para optar a la beca FPI con la que pude realizar las investigaciones que figuran en la tesis y por los inicios en la dirección de la misma que fue truncada con su prematura muerte. Descanse en paz. De él guardo un grato recuerdo por su amabilidad y sus admirables dotes explicativas.

A los profesores Juan Antonio Ordóñez Pereda, M^a Isabel Cambero Rodríguez y M^a Concepción Cabeza Briales por su valiosa dirección, orientación, paciencia y disponibilidad para compartir su amplio conocimiento durante estos años.

Muy especialmente a M^a Concepción Cabeza Briales, por ser más amiga que directora de tesis, por su importante aporte y participación activa en todo el desarrollo de esta tesis, y por sus consejos y experiencias tanto profesionales como personales. Básicamente por hacer fácil lo difícil.

A mi compañera de grupo Raquel Velasco, siempre generosa y dispuesta a todo. A Susana Manzano, que a pesar de incorporarse posteriormente, conectamos perfectamente. A todo el grupo, por hacer que esos “días de Tarancón” interminables, estuvieran llenos de risas y buen ambiente.

Al Dr. Manuel León Camacho por acogerme en su laboratorio del Instituto de la Grasa durante mi estancia y por tratarme como una más de su equipo.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, sin excepción. Con ellos he compartido laboratorio, sala de ordenadores, comidas e incontables horas de trabajo y buenos ratos, lo cual no tiene precio.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido a mi familia. A mi hermana Elena por estar siempre conmigo, a mi tío Humphrey porque ésto lo siente como si fuera suyo, a mis suegros por hacerme la vida más fácil, y a mi marido Javier por absolutamente todo.

A mis queridos padres

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
SUMMARY	13
1 INTRODUCCIÓN	17
1.1 LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	19
1.2 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL CERDO DOMÉSTICO.....	21
1.3 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA CARNE	22
1.3.1 Estructura del tejido muscular.....	23
1.3.2 Aspectos nutricionales de la carne	24
1.4 <i>RIGOR MORTIS</i> Y SU RESOLUCIÓN	30
1.5 DESPIECE	35
1.6 INDUSTRIALIZACIÓN DEL LOMO DE CERDO	37
1.7 PROPIEDADES SENSORIALES Y TEXTURA DE LA CARNE	40
1.7.1 Color.....	41
1.7.2 Olor y sabor de la carne.....	44
1.7.3 Textura de la carne	45
1.8 ALTERACIÓN DE LA CARNE	48
1.9 MICROORGANISMOS PATÓGENOS QUE POTENCIALMENTE PUEDEN CONTAMINAR LA CARNE.....	52
1.10 <i>Listeria monocytogenes</i>	55
1.10.1 Crecimiento y supervivencia	56
1.10. 2 Listeriosis	59
1.11 CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA CARNE	61
1.11.1 Antecedentes	61
1.11.2 Refrigeración y envasado de la carne fresca	61
1.11.2.1 Alteración de la carne refrigerada mantenida en aerobiosis o envasada con plásticos de elevada permeabilidad al oxígeno.....	63

1.11.2.2 Alteración de la carne refrigerada envasada a vacío	65
1.11.2.3 Alteración de la carne refrigerada envasada en atmósferas modificadas (MAP).....	67
1.12 IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS	72
1.12.1 Antecedentes	72
1.12.2 Irradiación de alimentos	73
1.12.3 Radiaciones ionizantes y sus fuentes	78
1.12.4 Dosimetría	81
1.13 EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES EN LOS MICROORGANISMOS	83
1.13.1 Destrucción de los microorganismos mediante radiaciones ionizantes	84
1.13.2 Sensibilidad de los microorganismos frente a las radiaciones ionizantes y factores de los que depende.....	85
1.14 EFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES EN LOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS	90
1.14.1 Lípidos.....	91
1.14.2 Proteínas	94
1.14.3 Carbohidratos	94
1.14.4 Vitaminas	95
1.14.5 Otros componentes e ingredientes.....	97
1.14.6 Repercusión en el valor nutritivo	98
1.15 CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS PRODUCTOS IRRADIADOS	98
1.16 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS	100
1.17. DETECCIÓN DE ALIMENTOS IRRADIADOS	104
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	107
3 MATERIAL Y MÉTODOS	115
3.1 MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO	117
3.2 LOMO DE CERDO FRESCO Y ADOBADO	118

3.3 MICROORGANISMOS	118
3.3.1 Recuperación de las cepas liofilizadas	119
3.3.2 Revitalización de cultivos	119
3.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	119
3.5 TRATAMIENTO CON ELECTRONES ACELERADOS.....	120
3.6 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	123
3.6.1 Medios de cultivo	124
3.6.2 Cinética de destrucción de <i>Listeria innocua</i> frente al tratamiento con electrones acelerados	124
3.6.3 Estudio de vida útil del producto y evolución de la microbiota endógena	125
3.7 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS	126
3.7.1 Actividad de agua (a_w)	126
3.7.2 pH.....	126
3.7.3 Humedad y cenizas.....	126
3.7.4 Capacidad de retención de agua (CRA)	127
3.7.4.1 Métodos basados en la pérdida de peso	128
3.7.4.1.1 Pérdida por goteo	128
3.7.4.1.2 Pérdida por cocinado.....	128
3.7.4.2 Método de compresión entre placas	128
3.7.5 Determinación instrumental del color	130
3.7.6 Determinación de atributos de textura	132
3.7.6.1 Análisis del perfil de textura (TPA)	133
3.7.6.2 Ensayo de tracción.....	135
3.7.7 Determinación de los atributos sensoriales	136
3.7.8 Análisis de fosfolípidos	138
3.7.8.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	140
3.7.9 Análisis de compuestos volátiles.....	142

3.7.9.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS).....	142
3.7.9.2 Caracterización de los compuestos volátiles	143
3.7.9.3 Análisis cuantitativo	144
3.7.10 Análisis de óxidos de colesterol	144
3.7.10.1 Reactivos y estándares.....	144
3.7.10.2 Extracción de COPs.....	144
3.7.10.3 Separación (GC) e identificación de COPs (GC/MS)	145
3.7.10.4 Caracterización y análisis cuantitativo de los COPs	147
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	147
3.8.1 Microbiología	147
3.8.2 Características físico-químicas.....	147
3.8.3 Análisis sensorial.....	148
3.8.4 Análisis del contenido de fosfolípidos, COPs y compuestos volátiles	148
4 RESULTADOS.....	149
ARTÍCULO 1	
Effect of E-beam on the shelf-life extension and safety of whole fresh pork loin.....	151
ARTÍCULO 2	
Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin.....	165
ARTÍCULO 3	
Changes in the phospholipid fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage	179
ARTÍCULO 4	
Changes in the volatile compounds of pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage	189
ARTÍCULO 5	
Characterization and quantification of the cholesterol oxidation product fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage.....	205
5 DISCUSIÓN INTEGRADORA.....	217
5.1 Antecedentes	219
5.2 Aspectos tecnológicos (ampliación de la vida útil).....	227

5.2.1 Oportunidad de la investigación.....	227
5.2.2 Consideraciones relativas al lomo fresco (Effect of E-beam on the shelf-life extension and safety of whole fresh pork loin)	228
5.2.3 Consideraciones relativas al lomo adobado (Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin)	236
5.3 Aspectos sanitarios (criterios de proceso respecto a <i>Listeria monocytogenes</i>).....	239
5.3.1 Consideraciones generales	239
5.3.2 Identificación del peligro	240
5.3.3 Caracterización del peligro.....	242
5.3.5 Estimación de los parámetros de seguridad alimentaria: objetivo de seguridad alimentaria, criterio del rendimiento y criterio del proceso	243
5.3.5.1 Objetivo de seguridad alimentaria (FSO)	243
5.3.5.2 Criterio de rendimiento (CR) y criterio de proceso (CP)	244
5.4 Otros aspectos de calidad del lomo tratado con electrones acelerados	248
6 CONCLUSIONES	255
7 BIBLIOGRAFÍA.....	259

RESUMEN

La industria cárnica es la cuarta parcela industrial de España, detrás de los sectores de la dimensión de la industria automovilística, la del petróleo y combustibles y la energía eléctrica. Es el primer subsector exportador del segmento agroalimentario. En 2014, exportó un total de 1,53 millones de Tm de productos frescos y 148.552 Tm de elaborados, lo que representó unas ventas de 4.467 M€, con una balanza comercial muy positiva, específicamente del 356% en 2013. El sector cárnico es, pues, una industria estratégica que es necesario defender, auxiliar y mantener en constante innovación. Esta tesis es un intento de esta naturaleza referido a lomo fresco y adobado de la especie porcina.

Ante la pregunta planteada por la industria: “¿Es posible aumentar la vida útil de lomo de cerdo fresco y adobado mediante la aplicación de electrones acelerados?”, subyacía la posibilidad de exportar carne fresca refrigerada a grandes distancias, como las requeridas para la distribución en países de la UE y terceros países y, en especial, cuando se atiende a países asiáticos, como Corea o Japón, donde, debido al carácter perecedero de la carne, se requiere el transporte en estado congelado. Bajo los principios de auxiliar, asistir e impulsar la industria cárnica española, se atendió a la propuesta y se acometió la investigación que se recoge en esta tesis.

La carne fresca es un producto perecedero con una vida útil muy corta, de no más de 7-10 días bajo refrigeración. Su alteración se debe típicamente al crecimiento de microorganismos psicotrofos Gram negativos; como los del género *Pseudomonas*. Además, a la carne pueden llegar patógenos procedentes de diversas fuentes (animales, manipuladores, equipos y utillaje de las industrias) que, por cuestiones sanitarias, es necesario controlar. El de mayor relevancia quizás sea *Listeria monocytogenes* por su ubicuidad, peligrosidad y carácter psicrotrófico. Es esta especie la que se ha considerado como “diana” en este trabajo.

La irradiación de alimentos se considera como una tecnología segura. Así lo han avalado la FAO/IAEA/WHO, FDA, AESA, EFSA y AESAN. Es una tecnología bien conocida pero apenas se ha utilizado industrialmente, empleándose como “último recurso” durante décadas. Sin embargo, repetidas veces se ha demostrado que la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos es un método muy útil para el control de microorganismos alterantes y patógenos no esporulados.

La investigación se ha conducido con un doble **objetivo**: por una parte, indagar si el tratamiento con electrones acelerados es adecuado para aumentar la vida útil e higienizar lomo fresco y adobado de cerdo mantenidos bajo refrigeración respecto, principalmente, a *L. monocytogenes* y, por otra, determinar el efecto de este tratamiento en distintos componentes, características físico-químicas y propiedades sensoriales del producto.

La **metodología** empleada, de forma muy resumida, fue la siguiente:

Las muestras (lomo de cerdo fresco y adobado) se trataron con electrones acelerados en la planta IONISOS IBÉRICA (Cuenca) a dosis entre 0,2 y 3 kGy. Se determinó la cinética de destrucción de *L. innocua* (sustituta de *L. monocytogenes*), se monitorizó la evolución de la microbiota (recuentos en los medios PCA, MRS, VRBG, CFC, STAA y Palcam), se determinaron las propiedades fisicoquímicas (a_w , pH, humedad y cenizas), los atributos del color (sistema CIELab) y de textura (TPA), las propiedades sensoriales (pruebas triangular, de ordenación y descriptiva) y el perfil de óxidos de colesterol (COPs), compuestos volátiles (GC/MS) y fosfolípidos (HPLC).

Los **resultados** más relevantes de esta tesis pueden resumirse en los siguientes puntos:

- La aplicación de 1 y 2 kGy a lomo fresco de cerdo (4 °C) amplía la vida útil desde 5 días de las muestras sin tratar a 11 y 20 días, respectivamente. Si se produjera un abuso de temperatura (incremento a 8 °C), se ampliaría de 3 a 8 y 16 días, respectivamente, con las dosis mencionadas. El tratamiento garantiza la eliminación de *L. monocytogenes* hasta un nivel seguro. Aunque la calidad sensorial se juzgó como ligeramente inferior que la del control después del tratamiento, tras 5 días de almacenamiento el producto fue calificado como de mayor calidad que el no tratado.
- La vida útil del lomo adobado de la especie porcina (4 °C) se amplió de 7 días, en muestras sin tratar, a 16 y >20 días mediante la aplicación de 1 y 2 kGy, respectivamente. En caso de abuso de temperatura (incremento a 8 °C), se ampliaría de 5 a 10 y 16 días, respectivamente, con las dosis mencionadas. El tratamiento garantiza la eliminación de *L. monocytogenes* hasta un nivel seguro. Los cambios composicionales, sensoriales y texturales pueden calificarse de imperceptibles, obteniéndose un producto perfectamente comercializable.

- Se observaron pequeñas diferencias en algunos volátiles de las muestras de lomo fresco y adobado, pero se debieron al efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento y tipo de envasado.
- Se produjeron pequeños cambios en algunos fosfolípidos, pero éstos derivaron de las condiciones seleccionadas y no del tratamiento ionizante; p. ej., la cardiolipina y la esfingomielina se vieron afectadas por el tipo de lomo, la cardiolipina por la temperatura de almacenamiento y la fosfatidiletanolamina por las atmósferas modificadas.
- Se detectaron seis especies químicas de COPs. En el lomo fresco se observaron diferencias, aunque mínimas, en la cantidad y composición de COPs, dependiendo sobre todo del envasado (mayores tasas en aerobiosis de 5-colesten-3 β ,7 β -diol) y de la temperatura (sólo en 5-colesten-3 β ,25-diols a 8°C). En lomo adobado se formaron menos COPs que en el producto fresco, probablemente debido a los antioxidantes presentes en el pimentón. En ningún caso, hubo efecto asociado a la dosis de irradiación, por lo que puede concluirse que la tecnología de electrones acelerados (al menos hasta dosis de 2 kGy) es una herramienta útil para prolongar la vida útil del lomo fresco y adobado sin que se produzcan cambios perceptibles en la composición de los COPs.

Como **conclusión general** puede decirse que la aplicación de electrones acelerados (entre 1 y 2 kGy) es una tecnología muy eficaz para ampliar la vida útil de carne de cerdo fresca y adobada y conseguir el objetivo de seguridad alimentaria, sin que se originen cambios importantes en los atributos composicionales, texturales y sensoriales.

SUMMARY

The meat industry is the fourth largest industrial segment of Spain, just behind of automotive, fuel and oil, and electrical energy industries. It is the leading exporter of the Spanish in the food and beverage sector. In 2014, 1.53 million tons of fresh meat and 148,552 tons of processed meat products were exported accounting for 4,467 M € sales with a very positive commercial balance sheet, namely a 356% in 2013. The meat segment is, therefore, a strategical industry, which is necessary to protect, to assist and to maintain in constant innovation. The present thesis is an attempt of this kind referred to both fresh and marinated pork loin.

The work is justified by the following inquiry raised by the industry, "Is it possible to extend the shelf-life of fresh and marinated pork loin through the application of accelerated electrons?" This is an issue of great concern in the long-distance, international trade of fresh meat, such as those required for distribution in EU countries and third countries, particularly in Asian countries, such as Korea or Japan where meat is required to be transported in a frozen state due to its perishable nature. Under the principles of aid, assistance and promotion of the Spanish meat industry, the proposal was attended and the research listed herein was conducted.

Fresh meat is a perishable product with a short shelf-life, no more than 7-10 days under refrigeration. Their spoilage is due to the growth of psychrotrophic Gram negative organisms, mainly those belong to the *Pseudomonas* genus. On the other hand, some pathogens may reach the meat from different sources (animals, surrounding atmosphere, handlers, equipment and other industrial facilities), which, for health issues, it is necessary to control. In this aspect, *Listeria monocytogenes* is perhaps the most concern organism due to its ubiquity, danger and psychrotrophic character. This species was considered the target organism in the present work.

Food irradiation is considered as a harmless technology, as it has been endorsed by FAO/IAEA/WHO, FDA, EFSA, AESA and AESAN. It is a well-known technology but it has barely been used industrially, being only applied for decades as a "last resort". Nevertheless, it has been demonstrated many times that the ionizing radiation application is a very useful method to control non-sporulating spoilage and pathogen microorganisms.

The research was performed with a dual **objective**: to inquire if the accelerated electrons (E-beam) are adequate to increase the shelf-life and to achieve the sanitation (with respect to *L. monocytogenes*) of refrigerated fresh and marinated pork loin and to determine the effects of this technology on several compounds, physic-chemical and sensory characteristics on the product.

Briefly, the **methodology** used was the following:

Samples (fresh and marinated pork loin) were E-beam treated in the IONISOS IBERICA plant (Cuenca) with 0.2 to 3 kGy. The death kinetic of *L. innocua* (*L. monocytogenes* surrogate) was established, the changes in the microbiota (counting in PCA, MRS, VRBG, CFC, STAA y Palcam media) were monitored and the physic-chemical properties (a_w , pH, moisture and ash) were determined. Moreover, the colour features (CIE*Lab* system) and texture (TPA), the sensory attributes (triangular, rang and descriptive tests), and the profile of cholesterol oxides (COPs), volatiles (GC/MS) and the phospholipids content (HPLC) were analyzed.

The most relevant **results** are summarized as following:

- The shelf-life of fresh pork loin (4 °C) was extended from 5 days in non-treated samples, to 16 and 20 days by the application of 1 and 2 kGy, respectively. If a temperature abuse (increased to 8 °C) occurs, it would be extended from 3 days to 8 and 16 days respectively with the above mentioned doses. This treatment ensures the reduction of *L. monocytogenes* number until a safe level. Although the sensory quality was judged to be slightly lower than the control just after treatment, after 5 days of storage, the product was regarded with a higher quality than that on non-treated one.
- The shelf-life of marinated pork loin (4 °C) was extended from 7 days in non-treated samples, to 16 and > 20 days by the application of 1 and 2 kGy, respectively. In the case of temperature abuse (increased to 8 °C), the shelf-life is extended from 5 days, to 10 and 16 days respectively, with the above mentioned doses. The treatment guarantees the elimination of *L. monocytogenes* to a safe level. Sensory changes may be considered as negligible, resulting in a perfectly marketable product.

- Minor differences in some volatiles of samples of both fresh and marinated loins were observed but these were due to temperature and storage time and type of packaging type.
- Small changes in some phospholipids were detected but they derived from selected conditions but no from the ionizing treatment; e.g., the cardiolipin and sphingomyelin were affected by the type of loin, the cardiolipin by the storage temperature and the phosphatidylethanolamine by the modified atmospheres.
- Six COPs chemical species were detected. Minimal differences were observed in the amount and composition of COPs in fresh loin depending on the packaging (higher levels in aerobically conditions for cholest-5-en-3 β ,7 β -diol) and temperature (only for the cholest-5-en-3 β , 25-diol at 8 °C) and storage time. In marinated loin, the amount of COPs formed was lower than that in fresh product, probably because of the natural antioxidants paprika content. In any case, these differences are entirely independent of the E-beam treatment, so it can be concluded that this technology (at least up to a dose of 2 kGy) is a useful tool for extending the shelf-life of fresh and marinated loin without changes in the COPs composition.

As a **general conclusion**, it can be said that the E-beam (1 to 2 kGy) is a very effective technology to extend the shelf-life of fresh and marinated pork meat and to reach the food safety objective with no major changes in the compositional, textural and sensory attribute.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El sector agroalimentario constituye la principal actividad de la industria manufacturera europea, representando el 14,9% de su facturación total y un valor superior a 1.017.000 millones de euros en 2012, lo que supone un incremento del 6,8% respecto al año anterior (MAGRAMA, 2012).

Cuenta con unas 287.000 empresas (UE-27), siendo la mayoría de ellas Pymes con menos de 250 trabajadores (un 99,1% del total), que dan empleo a 4,25 millones de personas, lo que supone el 63,4% del conjunto de puestos de trabajo que genera el sector agroalimentario en la UE. Por otro lado, la industria alimentaria española ocupa el quinto puesto en valor de ventas tras Alemania, Francia, Italia y Reino Unido. En España, la industria de alimentación y bebidas es la primera rama industrial (20,5%), seguida por la metalúrgica (12,1%) y la de vehículos a motor (11,9%) (MAGRAMA, 2014).

Según los datos aportados por la FIAB (2015), la industria española de alimentación y bebidas cerró en 2014 con una facturación que alcanzó los 93.238 millones de euros en ventas netas de productos del sector, lo que supuso, un crecimiento nominal del 1,95% respecto al año anterior. Así, mantiene su posición de primer sector industrial de la economía española. En lo que respecta al mercado exterior, en los últimos años se está consolidando la internacionalización del tejido empresarial de la industria de alimentación y bebidas con un crecimiento anual medio del 5% del número de empresas exportadoras. En este sentido, las exportaciones de esta industria alcanzaron los 24.018 millones de euros en 2014, lo que supone un 5,9 % más que en 2013, así como una cifra récord para el sector. Estos datos refrendan el potencial de la industria de alimentación y bebidas como primer sector industrial del país, lo cual le permite desempeñar un papel clave en el proceso de recuperación económica y erigirse como el principal motor económico de España.

La importancia del subsector cárnico queda muy bien reflejada por los datos elaborados por ANICE-CONFECARNE a partir de los suministrados por el MAGRAMA (ANICE, 2015). De forma resumida, la industria cárnica es la cuarta parcela industrial de nuestro país, por detrás solamente de los sectores de la dimensión de la industria automovilística, la del petróleo y combustibles y la producción y distribución de energía eléctrica. La industria cárnica, formada por mataderos, salas de despiece e instalaciones de producción de elaborados, tiene un tejido industrial constituido básicamente por algo más

de 3.000 empresas, la gran mayoría en la categoría de pequeñas y medianas, repartidas por toda la geografía nacional; de hecho, el 75% de las industrias cárnicas españolas tienen menos de 20 personas ocupadas, según el Instituto Nacional de Empleo (INE). Aunque su estructura está muy diseminada, la industria cárnica ocupa con diferencia el primer lugar del sector de alimentos y bebidas, representando en 2014 una cifra de negocio de 21.168 M€, más de un 21,6% de todo el sector alimentario español, lo que supone aproximadamente el 2% del PIB total y el 14% del PIB de la rama industrial. El empleo sectorial directo de las empresas cárnicas es de 80.979 trabajadores, equivalente a más del 20% de la ocupación total de la industria alimentaria española.

En 2014, la producción española de carne de porcino fue de 3.571.009 Tm, un 4% más que en 2013 (3.431.219 Tm), superando por primera vez la cifra histórica de 3,5 millones de toneladas. Aproximadamente, un 60% de la carne de cerdo es para consumo directo y el 40% para la producción industrial (ANICE, 2015). En cuanto a la producción de elaborados cárnicos, la producción española, con 1,3 millones de toneladas anuales, se sitúa en cuarto lugar en la UE, detrás de Alemania, Italia y Francia. Por productos, la producción en 2013 (ANICE, 2015) está encabezada por los fiambres cocidos (594.500 Tm), seguidos de jamones y paletas curados (254.000 Tm), embutidos curados (186.000 Tm), adobados y frescos (189.000 Tm) y platos preparados (87.500 Tm). En valor, los jamones y paletas curados (blancos e ibéricos) se sitúan a la cabeza. Cabe también añadir que la capacidad de producción de preparados cárnicos instalada en las empresas españolas se acerca a los 3 millones de Tm/año, si bien la utilización real es de algo superior al 38%, es decir, alrededor de 1.200.000 Tm, lo que permite señalar que la industria cárnica está en disposición de incrementar significativamente la producción si consigue mejorar el consumo interno y la exportación de sus productos elaborados.

Un dato muy relevante es el que se refiere a la exportación de productos cárnicos. La industria cárnica es el primer subsector exportador de la parcela agroalimentaria española, habiendo superado, ya en 2009, al sector del vino en su actividad exterior. En 2014, exportó a mercados de la UE y terceros países un total de 1,53 millones de toneladas de carne fresca y 148.552 Tm de elaborados, lo que representó unas ventas exteriores de 4.467 M€, un 15% superiores a los 3.875 M€ de 2013, que a su vez habían crecido un 17,1% respecto a los 3.112 M€ facturados en 2010, con una balanza comercial muy positiva del 460% (si en 2010 la tasa de cobertura fue del 229%, en 2011 se elevó hasta un

283%, en 2012 fue del 345% y en 2013 del 356%), un dato que muy pocos sectores económicos importantes pueden presentar y que contribuye a paliar el tradicional déficit comercial de nuestro país.

Esta sucinta radiografía de nuestro sector da idea de la relevancia económica, social, industrial y comercial de la industria cárnica como locomotora de la cadena de valor de la carne, singularmente de la de porcino, y de la importancia estratégica de que nuestras industrias cuenten con el apoyo científico-técnico para, tras la correspondiente transferencia de conocimiento desde los centros tecnológicos y universitarios, poner en el mercado productos cada vez más seguros, saludables y apetecibles (García, 2013).

1.2 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL CERDO DOMÉSTICO

Según los restos fósiles encontrados, hace 40 millones de años habitaba en los bosques y pantanos de Europa y Asia una especie de jabalí salvaje. Según un estudio basado en el ADN mitocondrial publicado en la revista *Science* (Larson y col., 2005), la domesticación del cerdo a partir del jabalí salvaje no se produjo tan sólo en un punto, sino en al menos siete, localizados en Oriente Medio, Oriente Lejano, islas del Sudeste Asiático y Europa, como el centro de Europa e Italia, Birmania, Tailandia, Myanmar y Nueva Guinea, además de Turquía, que pudo ser la primera. Adquirió considerable importancia como productor de carne en la época greco-romana. En la actualidad descende del cruce de los cerdos europeos, de la especie *Sus scrofa domestica*, con los importados de China, procedentes de la especie ancestral *Sus vittatus*. Dentro de la especie *Sus scrofa* hay razas procedentes de diferentes países y cruces de las mismas.

A modo de resumen puede decirse que el cerdo (*Sus scrofa domestica*) es una especie de mamífero artiodáctilo (orden *Artiodactyla*) de la familia *Suidae*. Es un animal doméstico usado en la alimentación humana por algunas culturas, en especial las occidentales. Su nombre científico es *Sus scrofa* subsp. *domestica*, aunque algunos autores lo denominan *Sus domesticus* o *Sus domestica*, reservando *Sus scrofa* para el jabalí.

Los esfuerzos encaminados a fijar las características deseadas de razas mejoradas, han conducido al reconocimiento de alrededor de 90 razas, con más de 200 variedades que se han agrupado en tres tipos principales: el cerdo céltico, el ibérico y el asiático. Entre estos, la agrupación racial “tronco ibérico” con varias estirpes es la variedad genuina de España (Suárez y col., 2002). La cabaña porcina de España en 2011 era de unos 25 millones de

cabezas (la segunda de la UE tras la de Alemania), de las cuales la mayoría (alrededor de 22 millones) pertenecía mayoritariamente a animales de capa blanca de las líneas genéticas Landrace y Large White por tener aptitudes para todos los parámetros productivos. No obstante, también está bastante difundida la línea Pietrain, dirigida fundamentalmente a la producción de individuos magros y la Duroc, más minoritaria, pero muy utilizada para su cruce con cerdos ibéricos. La cabaña del tronco ibérico comprende unos 2,5 millones de cabezas repartidas entre las estirpes antes mencionadas.

1.3 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA CARNE

La carne es fundamentalmente tejido muscular acompañado de cantidades variables de tejido conectivo y una pequeña porción de tejido epitelial. Además, contiene también fibras nerviosas y vasos sanguíneos que, en vida del animal, proporcionan un sistema de inervación y un lecho vascular para el aporte de nutrientes y eliminación de desechos.

En el animal vivo se distinguen, tanto por su estructura como por su función, tres tipos de tejido muscular: el estriado esquelético, el músculo cardíaco y el músculo liso. En la carne, la musculatura lisa sólo representa una pequeña proporción formando parte fundamentalmente de los vasos sanguíneos, mientras que el músculo cardíaco se limita al corazón. En consecuencia, esta memoria se referirá únicamente al músculo estriado esquelético, que es el más importante cuantitativamente en la carne, y a sus anejos.

La legislación alimentaria española define el término carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin”. Incluye la parte comestible de los músculos de los bóvidos, óvidos, suidos, cápridos, équidos y camélidos sanos, sacrificados en condiciones higiénicas. Por extensión, se aplica también a la de los animales de corral, caza de pelo y pluma, y mamíferos marinos. La carne ha de estar limpia, sana y debidamente preparada. El término carne incluye los músculos del esqueleto, los de la lengua y los del diafragma y esófago, con o sin grasa, así como porciones de hueso, piel, tendones, aponeurosis, nervios y vasos sanguíneos que normalmente acompañan al tejido muscular y que no se separan de éste en las operaciones de preparación de la carne.

1.3.1 Estructura del tejido muscular

La carne, como se ha mencionado, procede mayoritariamente del músculo estriado, el cual supone alrededor del 40% del peso corporal. Se compone de múltiples fibras individuales que se agrupan formando haces cuyo tamaño varía con el número de fibras asociadas. A su vez, varios haces se agrupan entre sí, rodeados de tejido conjuntivo y con infiltraciones de grasa, para dar lugar al músculo.

En la figura 1.1 se muestra un corte transversal de un músculo típico. Cada músculo está rodeado por una gruesa capa de tejido conectivo, el *epimisio*, que se prolonga hasta los extremos de los músculos y se une a otras estructuras conjuntivas para formar las aponeurosis y los tendones, por donde el músculo se ancla al tejido óseo. El tejido conectivo se prolonga hacia el interior en el músculo dando lugar a otro nivel, rodeando cada haz de fibras musculares, denominado *perimisio*, que divide al músculo en grupos de fibras llamados haces o fascículos. En el interior de estos se encuentra el *endomisio*, constituido por una capa de colágeno, elastina y reticulina, que rodea a cada fibra muscular de forma individual.

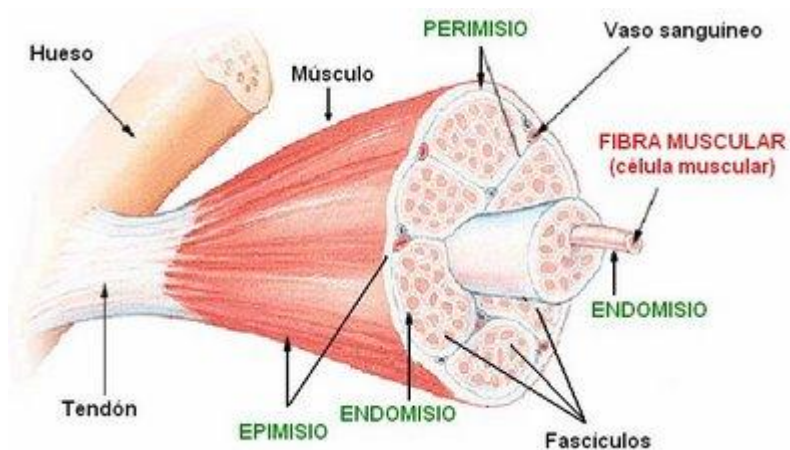


Figura 1.1 Esquema transversal de un músculo

Las fibras musculares, también llamadas miocitos, se encuentran distribuidas de forma paralela y están rodeadas de una membrana que se denomina sarcolema, conteniendo el sarcoplasma, un material semifluido que presenta proteínas solubles y pequeñas partículas de glucógeno, inclusiones de grasa y mitocondrias. El interior de la fibra contiene las miofibrillas (1 y 2 μm de diámetro) ordenadas longitudinalmente, que conforman el

aparato contráctil y son responsables del aspecto estriado del músculo. Según la relación miofibrillas y sarcoplasma se diferencian dos tipos de fibras: rojas y blancas. Las fibras rojas presentan un número reducido de miofibrillas, que se agrupan en determinadas zonas, denominadas campos de Cohnheim. El sarcoplasma es muy abundante y contiene una elevada cantidad de mioglobina (Mb), de mitocondrias y de gotas lipídicas. Son fibras de contracción lenta, sostenida y agotamiento pausado siempre que dispongan de oxígeno (Belitz y col., 2012). Presentan una baja actividad metabólica oxidativa, lipásica, hexoquinasa y de síntesis de glucógeno (Lawrie, 1998; Aberle y col., 2012). Las blancas, de contracción intensa, rápida y fugaz agotamiento, se caracterizan por la abundancia de miofibrillas que ocupan casi la totalidad del sarcoplasma. El sarcoplasma es muy escaso y también su contenido en Mb y mitocondrias. Estas fibras tienen mayor diámetro que las rojas, mayor contenido de glucógeno, creatín-fosfato (CP), ATP y fructosa 1,6-difosfato y mayor actividad fosforilasa, ATPásica y glucolítica. También existen fibras de tipo intermedio que comparten las características de las anteriores (Aberle y col., 2012). La fibra muscular suele ser polinucleada. En la mayoría de las especies animales las fibras rojas y blancas están más o menos mezcladas al azar en los haces musculares. Sin embargo, en el cerdo, en la mayoría de los músculos, las fibras rojas se localizan en forma de pequeños grupos cerca del centro de los fascículos y están rodeadas de fibras blancas que forman la periferia de los haces (Aberle y col., 2012).

Los músculos se clasifican como rojos o blancos basándose fundamentalmente en la intensidad de su color, que a su vez depende de la proporción de fibras rojas y blancas que contengan y éstas, en definitiva, del contenido en Mb.

1.3.2 Aspectos nutricionales de la carne

La carne, en general, es un alimento eminentemente proteico. No obstante, desde el punto de vista nutricional, la composición de la carne puede variar debido a diversas causas, entre las que cabe destacar la especie animal, piezas o músculos de que se trate y su procesado. Además, dentro de cada especie hay variaciones dependiendo de la raza, edad o alimentación entre otros factores. La edad influye en la proporción de grasa y proteínas, los animales más viejos tienen más grasa intramuscular que los más jóvenes ya que al avanzar la edad, mayor es la grasa acumulada y menor el contenido en colágeno pero, sin embargo, presentan una dureza mayor que se debe a la mayor abundancia de entrecruzamientos entre las fibras de colágeno (Toldrá y col., 1996). Los machos, en general, contienen menos

grasa intramuscular que las hembras, mientras que los cerdos castrados presentan más grasa que los machos y las hembras (Toldrá y col., 1996; Wood y col., 1989). Entre los factores extrínsecos, el más importante es la alimentación, influyendo en las cualidades de la carne obtenida, pues si se aumenta en la dieta el contenido de hidratos de carbono o de grasa, aumenta el engrasamiento de las canales (Ordóñez y col., 1998). Por otra parte, al ser animales monogástricos, la composición en ácidos grasos depende poderosamente de los presentes en la dieta.

En la fracción comestible de la carne fresca el 65-80% de su peso es agua, y en ella se encuentran disueltos o suspendidos numerosos componentes químicos, ciertas proteínas (16-22%), lípidos (3-13%), cenizas (1-1,5%) y otros componentes minoritarios como sustancias nitrogenadas no proteicas (aminoácidos libres, péptidos, nucleótidos, creatina), carbohidratos (trazas), ácido láctico, minerales y vitaminas. El poder energético normal se sitúa en unos 1050 kJ/100 g (valores adecuados para carnes con un recubrimiento graso de aproximadamente 1 cm de espesor). La composición típica del músculo magro es del 20% de proteína, 9% de grasa, 70% de humedad, 1% de cenizas y alrededor de 670 kJ/100 g. La carne comercial no posee prácticamente carbohidratos (menos del 1%) y carece de fibra alimentaria (Price y Schweigert, 1994). En la tabla 1.1 se detalla la composición general de diversos cortes de algunos animales de abasto.

Tabla 1.1 Composición química (g/100 gramos) y valor energético (kcal y kJ/100g) típicos de diferentes cortes de carnes de algunos animales de abasto

Carnes	Agua (g)	Energía		Proteínas	Lípidos	Hidratos de Carbono
		(kcal)	(kJ)			
Añojo (lomo)	64,00	252,00	1054,00	14,40	21,60	Trazas
Añojo (solomillo)	81,10	98,30	411,00	14,30	4,60	0,00
Cerdo (lomo)	58,40	300,00	1255,00	15,20	26,60	Trazas
Cerdo (magro)	71,10	152,00	636,00	21,00	7,60	Trazas
Cordero (chuletas)	64,10	247,00	1033,00	15,40	20,60	0,00
Cordero (pierna/paletilla)	77,60	148,00	619,00	10,60	11,80	0,00
Ternera (lomo)	78,20	117,00	490,00	15,80	6,00	0,00
Ternera (solomillo)	78,10	100,00	416,00	19,30	2,50	Trazas
Pollo (muslo)	77,20	109,00	456,00	19,50	3,40	Trazas
Pollo (pechuga)	74,60	122,00	510,00	21,30	4,10	Trazas
Conejo	84,80	86,70	363,00	10,10	5,20	Trazas

Fuente: Ministerio de Sanidad y Consumo. Tablas de composición de alimentos españoles. 1995. Manual de Industrias Cárnicas II.

El **agua** de la canal se encuentra principalmente en el tejido muscular magro; el tejido adiposo contiene poca agua. Muchas de las propiedades físicas de la carne, como el color,

la textura y la firmeza, dependen en parte de la capacidad de retención de agua (CRA) de la carne, que está muy relacionada con el pH final de la misma. El contenido en agua de la carne de cerdo es, aproximadamente, del 75%, siendo muy similar al de otras especies de abasto como pollo y vacuno (Primo, 1997; Fennema y col., 2010).

Las **proteínas** constituyen aproximadamente el 16% de la masa muscular de la canal, siendo el componente principal de la materia sólida. Aunque no alcanzan el valor nutritivo de otras proteínas de origen animal (ovoalbúmina, proteínas del suero lácteo y pescado), se consideran también de alta calidad (Rojas y Guerrero, 1998) porque suministran cantidades adecuadas de todos los aminoácidos esenciales. Las proteínas vegetales, por el contrario, carecen de uno o más de estos aminoácidos. Además, por lo general, las proteínas de la carne y productos cárnicos tienen una digestibilidad del 95-100%, mientras que la de los alimentos vegetales es significativamente menor, del orden del 65-75% (Hopkins, 1981).

Atendiendo a su solubilidad, las proteínas cárnicas se encuadran en tres grupos: sarcoplásmicas, miofibrilares y del estroma.

Las proteínas sarcoplásmicas se han clasificado por centrifugación diferencial en cuatro fracciones (Bodwell y McClain, 1976):

- nuclear, compuesta por nucleoproteínas y lipoproteínas;
- mitocondrial, que corresponde a las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y a las de la cadena transportadora de electrones;
- microsomial, que incluye microsomas, retículo sarcoplásmico, sistema tubular T y lisosomas; y
- citoplásmica, que comprende las enzimas de las vías glucolíticas y glucogénicas, Mb, proteínas y enzimas solubles del sistema de citocromos.

Las proteínas sarcoplásmicas son solubles en solución salina diluida y están constituidas, en su mayoría, por los sistemas enzimáticos que operan en el metabolismo celular. En este grupo, cabe destacar la Mb, pigmento responsable del color de la carne.

Las proteínas miofibrilares, solubles en solución salina concentrada, son las asociadas con los filamentos gruesos y finos: actina, miosina, tropomiosina, troponina, actinina alfa y beta, proteína C y proteína M. Son las responsables de la estructura muscular y de la transformación de la energía química en energía mecánica durante los fenómenos de

contracción y relajación muscular. Representan aproximadamente la mitad de las proteínas del músculo y sus componentes más importantes, la miosina y la actina, constituyen a su vez el 50% y el 25% del total de éstas (Arguedas, 1995).

Las proteínas del estroma constituyen las fibras extracelulares de colágeno, elastina y reticulina; forman parte del tejido conectivo que recubre las fibras y los haces musculares. Se distribuyen por todo el organismo, formando parte del esqueleto y de la estructura de órganos, tendones, nervios, pezuñas, piel, etc. Son insolubles en medio neutro. Presentan muy bajo valor biológico porque carecen de triptófano y de lisina. Los aminoácidos mayoritarios son glicina (una tercera parte del total), prolina e hidroxiprolina (hasta el 10%). Por otra parte, son de las pocas proteínas que contienen hidroxilisina.

El contenido en **lípidos** de los músculos es variable, su concentración está relacionada inversamente con el contenido en agua. La mayoría de los lípidos se localizan en los depósitos de tejido adiposo y en el tejido muscular (Love y Pearson, 1971), asociados a los septos del tejido conectivo laxo que se encuentran entre los haces musculares (grasa intramuscular) formando lo que se conoce como veteado o marmorización. Estos lípidos dan jugosidad a la carne y, además, se comportan como un aislante que permite que la carne infiltrada pueda ser sometida a mayores tratamientos térmicos con mínima pérdida de calidad.

La cantidad de grasa de un animal y, por tanto, de la canal, varía con la especie (Tabla 1.2), la raza (Tabla 1.3), el sexo, la edad, la localización anatómica del músculo (Tabla 1.4) y el grado de engrasamiento, entre otros factores.

Tabla 1.2 Perfil típico de los ácidos grasos (% del total) mayoritarios de la fracción lipídica intramuscular de diferentes especies animales de abasto.

Ácidos grasos	Cordero	Vaca	Ternera	Cerdo	Pollo
C12:0 (laúrico)	0,22	0,00	0,00	0,16	0,00
C14:0 (mirístico)	3,13	3,10	1,92	1,31	1,10
C16:0 (palmitico)	22,82	25,96	23,56	24,39	23,08
C16:1 (palmitoleico)	3,58	4,39	4,33	3,44	3,30
C18:0 (esteárico)	13,87	13,53	14,42	11,95	10,99
C18:1 (oléico)	42,30	43,88	39,42	45,50	27,47
C18:2 (linoleico)	8,05	3,66	10,10	9,66	18,68
C18:3 (linolénico)	1,57	0,18	0,48	0,65	1,10
C20:4 (araquidónico)	1,12	0,54	3,85	1,31	4,40
Saturados	41,96	44,79	41,35	38,30	36,26
Monoinsaturados	47,20	50,45	44,23	50,08	32,97
Poliinsaturados	10,74	4,75	14,42	11,62	30,77

Fuente: NLSMB (1988)

Tabla 1.3 Comparación de la fracción de lípidos (% de peso fresco) de *longissimus dorsi* de razas puras de cerdos

Raza	Contenido lipídico
Large White	1,24
Landrace francés	1,19
Landrace belga	1,67
Piértrain	1,35
Duroc	2,41
Tia Meslan	1,53
Gallia	1,51
Penshire	1,66
Laconie	1,60
Meishan	3,07

Fuente: Mourot y Hermier (2001)

Tabla 1.4 Contenido lipídico (%) de algunos músculos del cerdo Large White en edad de sacrificio.

Músculo	Contenido de lípidos
<i>Longissimus dorsi</i>	1,30
<i>Abductor femoris</i>	2,00
<i>Biceps femoris</i>	1,40
<i>Trapezius</i>	2,00
<i>Masseter</i>	1,80
<i>Semimembranosus</i>	1,70
<i>Semitendinosus</i>	3,50

Fuente: Mourot y Hermier (2001)

La mayor parte de los ácidos grasos del material lipídico corresponde a los triglicéridos, aunque hay pequeñas cantidades de di- y monoglicéridos (Prändl y col., 1994). Los fosfolípidos son componentes esenciales de las membranas celulares, participan en la regulación del metabolismo celular y son relativamente constantes (0,8-1,0%) en los tejidos magros (Horstein y col., 1961). Los fosfolípidos contienen una proporción considerable de ácidos grasos poliinsaturados, lo que resulta de importancia en la alteración química de la carne por ser en estos ácidos grasos donde se inicia con mayor facilidad el enranciamiento autooxidativo de los lípidos (Dugan, 1976) que origina cambios en el aroma, el color y el flavor de la carne, y que se ve acelerado con el calentamiento (Sato y Hegarty, 1971; Sato y col., 1973). La composición en ácidos grasos, además de ser importante para la consistencia, influye en la calidad sensorial. Los ácidos grasos insaturados más comunes en los lípidos de la carne son los ácidos oleico (C-18:1 n9), linoleico (C-18:2 n6) y linolénico (C-18:3 n3) (Bodwell y Anderson, 1986).

El colesterol, aunque es un componente minoritario de la fracción lipídica, tiene importantes funciones fisiológicas (compuesto clave de ciertas hormonas como los estrógenos y la testosterona, participa en la síntesis de vitamina D y en la arquitectura y mantenimiento de las membranas celulares) y aparece en todos los tejidos animales como componente esencial de la membrana celular. Los músculos magros de vacuno, cerdo y cordero contienen entre 40 y 80 mg de colesterol por 100 g de músculo (Gandemer, 1992; Flores y Nieto, 1985), del que más del 90% se encuentra en forma libre (Tu y col., 1967; Lawrie, 1981).

Los **minerales** tienen un papel significativo en la conversión del músculo en carne. El magnesio y el calcio contribuyen al estado de contracción *post mortem*, influyendo

indirectamente, por tanto, en la dureza de la carne. Están relacionados también con la CRA, por su implicación en los efectos estéricos (Price y Schweigert, 1994).

En la carne fresca, el contenido en minerales es del 1%. Desde el punto de vista nutricional, el hierro es el que alcanza mayor relevancia por su elevado contenido en relación con otros alimentos y por su gran disponibilidad, lo que se debe a que se encuentra en forma hemo, presentando una excelente absorción y, además, potencia la absorción del hierro procedente de otras fuentes (Godber, 1994). La carne también es una importante fuente de zinc; sin embargo, es bastante pobre en calcio (Moreiras y col., 1995). Otros oligoelementos presentes son el flúor, el bromo, el yodo, el silicio, el manganeso y el cobre (Prändl y col., 1994).

Las **vitaminas** más abundantes en las carnes son las hidrosolubles, fundamentalmente del grupo B, destacando la B₂ (riboflavina), B₆ (piridoxina), B₁₂ (cianocobalamina) y niacina, de las cuales proporcionan un 25-50% de las necesidades diarias (Windham y col., 1990). Las vitaminas liposolubles se encuentran en muy pequeñas cantidades y se localizan en las fracciones lipídicas.

1.4 RIGOR MORTIS Y SU RESOLUCIÓN

La carne, en su definición más simple, es el tejido animal, principalmente muscular, que se consume como alimento. La carne de cerdo es una de las más consumidas por el hombre, tanto a nivel nacional como mundial. El cerdo se encuentra entre los animales más eficientemente productores de carne; sus características particulares, como gran precocidad y prolificidad, corto ciclo reproductivo y gran capacidad de conversión de nutrientes, lo hacen especialmente atractivo como fuente de alimentos proteicos para la población.

La carne que se utiliza directamente para su consumo o como materia prima para posteriores transformaciones surge como consecuencia de dos fenómenos que ocurren en el tejido muscular tras el sacrificio del animal: *rigor mortis* y maduración (Figura 1.2). El desarrollo de ambos procesos, aparte de la región anatómica de procedencia, va a determinar en gran medida la calidad de la carne, tanto en sus cualidades sensoriales como en su aptitud tecnológica para la elaboración de productos cárnicos. Estos cambios son fundamentalmente de carácter físico-químico, cuyo mecanismo y fases se encuentran descritos en diversas obras, p. ej. Lawrie (1998), Fennema y col. (2010) o Belitz y col. (2012).

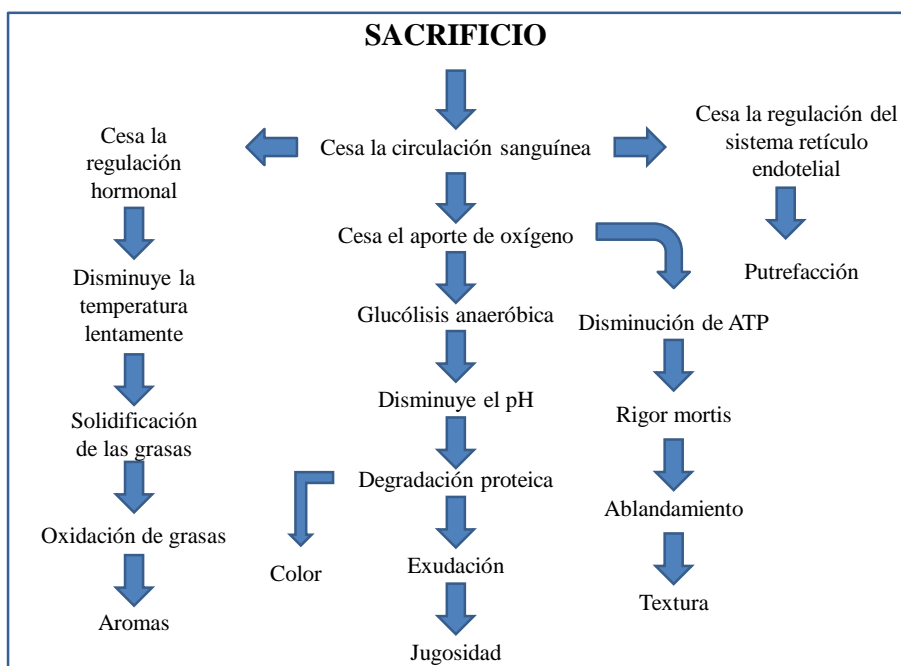


Figura 1.2 Representación esquemática de la transformación del músculo en carne: Desarrollo del *rigor mortis* y su resolución

Interrupción del metabolismo aeróbico. Una vez el animal ha sido sacrificado, cesa el aporte de oxígeno al músculo a través de la sangre y se producen importantes modificaciones en el metabolismo de la fibra muscular para adaptarse a las nuevas condiciones, comenzando la transformación del músculo en carne. La interrupción del metabolismo aerobio provoca el fallo en el suministro de la energía indispensable para mantener el estado fisiológico del músculo. El dinamismo del músculo se perturba, pero necesita mantener sus niveles de ATP para intentar seguir realizando las funciones que le caracterizan, mantener su temperatura y la integridad estructural de sus células (Lawrie, 1998).

En el animal vivo, el aporte de ATP se realiza fundamentalmente a partir de la glucólisis aerobia. Sin embargo, al interrumpirse y agotarse la cantidad de oxígeno residual de la Mb, cesa el metabolismo aerobio de la glucosa. En un primer momento, el nivel de ATP muscular se mantiene por la conversión del ADP en ATP a expensas del CP, pero éste se agota debido a la actividad constante de la ATP-asa sarcoplasmática, descendiendo la concentración de ATP (Penny, 1984) y produciéndose simultáneamente fosfato inorgánico que, a su vez, estimula la degradación anaeróbica del glucógeno a ácido láctico (Lawrie, 1998) que, si bien su rendimiento es mucho menor que el de la ruta aerobia,

proporciona una fuente de ATP suficiente para satisfacer temporalmente las necesidades energéticas del músculo.

Instauración del *rigor mortis*. Una vez que se han consumido las reservas de CP y glucógeno, la refosforilación del ADP resulta insuficiente para mantener el músculo en un estado de relajación (Aberle y col., 2012) de forma que cuando los niveles de ATP bajan hasta valores inferiores a 0,1 $\mu\text{mol/g}$, comienzan a establecerse enlaces permanentes entre los filamentos de actina y miosina que son los responsables de los cambios físicos característicos del *rigor mortis* (Bendall, 1973), como pérdida de elasticidad y de extensibilidad, y acortamiento y aumento de la tensión en la fibra muscular. El fenómeno bioquímico que origina dichos enlaces entre los filamentos de actina y miosina es el mismo que tiene lugar cuando se forma actomiosina durante la contracción muscular en vida (Bendall, 1951), con la diferencia de que en *post-mortem* el fenómeno es irreversible al no disponer de energía para escindir la actomiosina (Aberle y col., 2012).

Descenso del pH. En el animal vivo, el ácido láctico que se origina en el metabolismo anaeróbico de la glucosa se transporta, previa transformación en piruvato merced a la lactato deshidrogenasa, desde el músculo hasta el hígado, donde se utiliza para la síntesis de glucógeno. El piruvato se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), rindiendo oxalacetato y a partir de éste se forma el fosfoenolpiruvato que ingresa en la ruta de la gluconeogénesis para dar glucosa-6-fosfato y, finalmente, glucógeno mediante la glucogénesis. En el animal sacrificado, al no operar el sistema circulatorio, el ácido láctico se acumula en el músculo, aumentando su concentración a medida que prosigue el metabolismo anaerobio hasta que todo el glucógeno almacenado en el músculo se agote o hasta que se alcancen las condiciones que detienen la glucólisis anaerobia (Aberle y col., 2012). El resultado es el descenso del pH muscular. La velocidad con que cae el pH y su valor final son muy variables, lo que viene determinado por diversos parámetros; entre ellos la especie animal, manejo de los animales previo al sacrificio, estado fisiológico del animal, tipo de canal, tipo de músculo, etc., así como todos aquellos factores que influyan en la evolución de la temperatura de la canal. Los músculos con predominio de fibras de contracción rápida (blancas) alcanzan valores finales de 5,5, mientras que en los músculos en los que predominan las fibras de contracción lenta (rojas) el pH no baja de 6,3 (Ordóñez, y col., 1998).

De forma general, puede considerarse que la caída del pH en el músculo del cerdo viene representada por el descenso gradual (unas 0,64 unidades/h a 37 °C) desde un valor de alrededor de 7 en el músculo del animal vivo hasta 5,6-5,7 transcurridas 6-8 h del sacrificio, para alcanzar un pH último (generalmente 24 h después de la muerte) de aproximadamente 5,4-5,7. No obstante, en algunas especies el pH sólo desciende unas pocas décimas durante la primera hora después del sacrificio (en vacuno, ovino y conejo, desciende 0,27-0,44 unidades/h) (Ordóñez y col., 1998), permaneciendo estable a valores relativamente altos, llegándose a un pH final que varía entre 6,5 y 6,8. Por el contrario, en otros animales, el pH desciende rápidamente hasta 5,4-5,5 en la primera hora después de la sangría, alcanzando un pH incluso inferior a 5,5 (Aberle y col., 2012). En ocasiones se presentan valores de pH anormalmente tanto bajos (carnes PSE; *pale, soft, exudative*) como altos (carnes DFD; *dark, firm, dry*). Lo que caracteriza el desarrollo de carnes PSE es una glicolisis postmortal muy rápida que causa un pH muy bajo. El descenso de pH es mucho más rápido en una carne PSE que en una normal pudiéndose alcanzar en las primeras el pH final sólo a los 15-20 min *post mortem*, cuando la temperatura del músculo es todavía alta. El bajo pH ocasiona una precipitación de las proteínas sarcoplásmicas y una menor CRA debido a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares. Además, origina una estructura abierta de las fibras musculares dando lugar a carnes más pálidas, blandas y exudativas. Las carnes DFD se caracterizan por un pH elevado debido a una baja concentración de glucógeno muscular, dando lugar a carnes más secas y oscuras, reflejo de su mayor CRA.

Evolución de la temperatura. Como consecuencia de la sangría, el calor que se origina en las zonas orgánicas profundas no puede transmitirse mediante el sistema circulatorio a los pulmones y áreas superficiales para su disipación, por lo que se produce un ligero aumento de la temperatura corporal. La magnitud del aumento de la temperatura y la velocidad con que descenderá posteriormente dependen de diversos factores, como la velocidad de producción metabólica de calor, el tamaño y situación del músculo, la grasa que lo recubre, ciertas operaciones como el escaldado y, por supuesto, la temperatura del entorno de las salas de sacrificio y refrigeración.

La temperatura del músculo está estrechamente relacionada con el descenso del pH y juega un papel decisivo en la velocidad del proceso de maduración de la carne y, consecuentemente, en las características físicas de la misma, como dureza, CRA y color

(Pearson, 1976; Lawrie, 1998; Aberle y col., 2012). La glicolisis y la consiguiente caída del pH transcurren más lentamente cuanto menor es la temperatura de la carne. Un enfriamiento rápido retrasa los fenómenos postmortales y la rigidez cadavérica aparece más tarde que cuando la temperatura de la carne es mayor (Ordóñez y col., 1998).

Las proteínas del músculo se desnaturalizan cuando su pH es menor que el existente *in vivo* y las temperaturas son superiores a 25 °C o están por debajo de 0 °C. Las proteínas más sensibles a la desnaturalización son las sarcoplásmicas, mientras que las del estroma apenas sufren modificación durante la maduración de la carne. Como el punto isoelectrico de las principales proteínas del músculo está próximo a los valores de pH finales que se alcanzan en el metabolismo *post-mortem* del músculo (5,4-5,5), la CRA de la carne es mínima cuando se alcanza el pH final. Por la misma razón, los valores de pH elevados conllevan una textura más dúctil. Asimismo, cuando más alta sea la temperatura durante la glucolisis *post-mortem*, mayor será la desnaturalización de las proteínas sarcoplásmicas, por lo que la exudación también aumentará.

Con la desnaturalización de una de las proteínas sarcoplásmicas, la Mb, se acelera la oxidación del Fe^{2+} de su molécula a la forma Fe^{3+} , adquiriendo el pigmento un color marrón. Aunque este fenómeno no es cuantitativamente importante si se considera de forma global toda la masa muscular, sí que lo es en la superficie, afectando decisivamente al aspecto externo (color) de la carne.

Resolución del *rigor mortis* (maduración de la carne). La dureza de la carne aumenta a medida que el músculo entra en rigidez, alcanzando el máximo a las 24 h *post-mortem* (Dransfield y Rhodes, 1975; Cia y Marsh, 1976). Sin embargo, el estado rígido desaparece gradualmente durante la maduración y los músculos se relajan e incluso se despliegan, aunque no debido al mecanismo de contracción-relajación, hasta aproximadamente la misma longitud que tenían cuando estaban en *pre-rigor* (Penny, 1984). Estos cambios no van acompañados de un aumento en la extensibilidad del músculo, ni hay evidencia de que se produzca una disgregación de la actomiosina (Bendall, 1960), sino que la resolución aparente del *rigor mortis* se debe a una degradación física de la estructura muscular, tanto del tejido conectivo como de las miofibrillas, aunque principalmente afecta a estas últimas.

Las proteínas del tejido conjuntivo, a pesar de que juegan un papel importante en la dureza de la carne, no sufren una degradación masiva durante la maduración (McClain y col., 1970; Pfeffer y col., 1972), por lo que son de escasa importancia en el fenómeno de ablandamiento que se produce tras el *rigor mortis*. Sin embargo, durante la conversión del músculo en carne, se liberan enzimas (proteinasas) propias de la carne (Swatland, 1991) que hidrolizan enlaces peptídicos, ocasionando una fragmentación proteica que se traduce en un ablandamiento paulatino (Abbott y col., 1977). Durante la maduración, los filamentos de actina se separan de sus uniones a los discos Z (Parrish y col., 1973; Gann y Merkel, 1978), lo que corre a cargo de ciertas peptidasas endógenas, fundamentalmente las catepsinas y el factor activado por el calcio (FAC) (Penny, 1984). Las catepsinas, entre las que destacan la B y D, son enzimas proteolíticas con actividad óptima a valores de pH ácido (5,2 y 4,0 respectivamente) (Asghar y Henrickson, 1982) que se encuentran en los lisosomas de las fibras del músculo esquelético (Schwartz y Bird, 1977; Venugopal y Bailey, 1978) y otros tejidos (Franklin y Metrione, 1972; Barret, 1973). El FAC es una peptidasa muscular de amplia distribución que se activa en presencia de iones Ca^{2+} (Philips y Jakabova, 1977; Inoue y col., 1977) y con una actividad óptima a valores de pH entre 7,0 y 7,5 (Reddy y col., 1975). En un músculo con catepsinas que contiene una baja concentración de FAC no se observa degradación de las miofibrillas durante el almacenamiento. Esta es la prueba más concluyente de que el FAC es la principal enzima responsable de la maduración *post-mortem* (Penny, 1984), si bien, a medida que el pH muscular desciende por debajo de 6, las catepsinas pueden tener mayor actividad e influir en los cambios madurativos.

1.5 DESPIECE

El despiece de la canal se realiza habitualmente siguiendo las juntas de los músculos que la propia anatomía del animal sugiere, dando lugar a un conjunto de piezas cárnicas de menor tamaño y de éstas, a su vez, se practican fracciones aún más pequeñas para su transformación en productos cárnicos o comercialización al detalle. El despiece del cerdo es distinto según la finalidad de la carne y cada pieza tendrá una valoración distinta según sea su destino. Aunque el despiece se realizaba de acuerdo a hábitos tradicionales de cada lugar, la unificación de criterios de mercado ha llegado a establecer un despiece normalizado para la comercialización de canales de cerdos magros destinados al consumo de carne fresca. De esta forma, según Gispert y Diestre (1999), el despiece normalizado

pretende obtener 17 piezas diferentes: patas, morro, careta, oreja, rabo, jamón, paletilla, chuletas, lomo, solomillo, papada, panceta, tocino y similares. El despiece debe realizarse en una sala refrigerada y en condiciones higiénicas óptimas, con el objetivo de reducir al máximo la contaminación de la carne y minimizar el crecimiento de los microorganismos presentes mientras dure la operación y partir de la carga microbiana más baja posible para el almacenamiento posterior y otras operaciones que se practiquen.

Desde el punto de vista económico, se considera que las piezas más nobles de la canal son jamón, solomillo, costillar (comprendido por el lomo y las costillas) y la cabeza del lomo. Las piezas de menor valor son las que presentan mayor cantidad de grasa o hueso. En la figura 1.3 se muestran las piezas que habitualmente se obtienen a partir de la canal del cerdo.

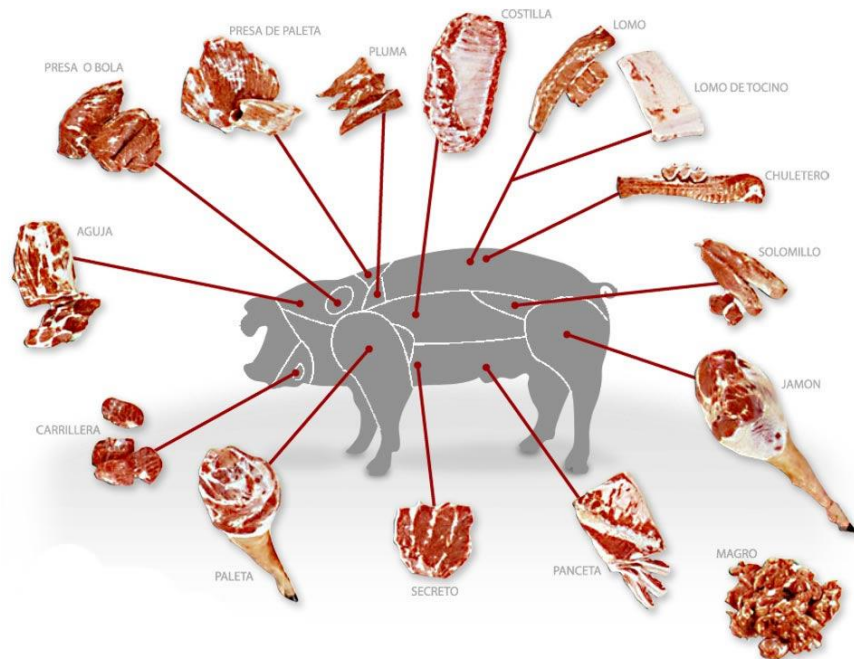


Figura 1.3 Despiece habitual de la canal de cerdo

Puede afirmarse que del cerdo se aprovecha más del 95%, aunque el rendimiento en canal del peso vivo se sitúa en torno al 75-80%. El rendimiento de la canal depende de la especie, edad y alimentación del animal.

1.6 INDUSTRIALIZACIÓN DEL LOMO DE CERDO

El presente trabajo se ha llevado a cabo utilizando lomo de cerdo, tanto fresco como adobado, como modelo experimental. La elección de este producto se realizó a petición de la industria, la cual pretendía conocer la posibilidad de aumentar la vida útil de lomo refrigerado. Por ello, únicamente se describirán las características de esta pieza comercial.

El lomo, del latín *lumbus*, corresponde al músculo *longissimus dorsi* que se localiza en el espinazo, bajo las vértebras lumbares y cubierto por las costillas, llegando hasta el ilion. Es, junto al solomillo, la pieza de más alta calidad de la canal. Su peso es variable dependiendo del tamaño del animal, pero habitualmente se sitúa entre 2 y 5 kg y se comercializa fresco, adobado o curado.

Como toda carne fresca, presenta una vida útil muy corta, típicamente de unas 24 horas a temperatura ambiente y no más de 5-7 días bajo refrigeración (García-Márquez y col., 2012a), debido a su contenido en nutrientes, pH (normalmente alrededor de 5,5) y una actividad de agua (a_w) del orden de 0,99, todos ellos factores favorables para el crecimiento microbiano. Este tiempo a veces es insuficiente para que el producto llegue al consumidor en condiciones adecuadas, por lo que cualquier acción que permita aumentar su vida útil sería muy interesante desde el punto de vista comercial.

La ampliación de la vida útil de la carne ha sido un deseo de la humanidad desde los tiempos más remotos. Los aborígenes de América consumían un producto llamado “*charqui*” (se corresponde con el que actualmente se denomina “*tasajo*”) que, en esencia, era carne adicionada de sal y untada con condimentos locales, que se exponía al sol en zonas secas y ventiladas. Las técnicas de ahumado y salazón eran conocidas antes de Homero (año 1000 a. de C.); la elaboración y especiado de algunos tipos de embutidos era común en Europa y en la zona mediterránea mucho antes del tiempo de los césares (Price y Schweigert, 1994). Los celtas aprendieron a salazar jamón y otros productos del cerdo y el geógrafo y viajero Estrabón, coetáneo de Cesar Augusto, decía que los jamones más apreciados procedían de los bosques de Borgoña, en aquellos tiempos territorios celtas. Asimismo, en algunos puntos de Hispania ya se salaban pernils asiduamente. El gran desarrollo de los métodos de adobo y conservación de la carne también fue muy importante en la Edad Media. Existen referencias del adobo de carne en diferentes épocas, pero no se puede decir con exactitud el momento en el que empezó. En cualquier caso, las fuentes

bibliográficas informan que en la época lombarda (500–770 d. de C.), el adobo de la carne de cerdo recibió un fuerte empuje. En España, aparece en las novelas picarescas. Así, en el “Lazarillo de Tormes” (1554) en la frase “...*un día que el cuitado ruin y lacerado de mi amo había ido fuera del lugar, llegóse acaso a mi puerta un calderero, el cual yo creo que fue ángel enviado a mí por la mano de Dios en aquel hábito. Preguntóme si tenía algo que adobar*”, se desprende que se utilizaba esta técnica para conservar alimentos. Igualmente, en el “Guzmán de Alfarache”, de Mateo Alemán (siglo XVI), entre otras frases donde se cita el adobo de carne, figuran las siguientes: ...”*hizo la carne postas, echólas en adobo, aderezó para este sábado el menudo, asadura, lengua y sesos...*”, “...*vendía también lenguas de boca, cecinas de jabalí, lomo en adobo, empanadas inglesas de venado...*” o “*Y aunque con temor de ser del compañero reprehendido, dije al huésped:*

- *Esta carne, ¿cómo está tan tiesa y de mal sabor, que no hay quien hinque los dientes en ella? Respondióme:*

-*¿No ve, señor, que es fresca y no ha tomado el adobo?*

Mi camarada dijo:

- *No lo hace el adobo, sino que este gentilhombre se ha criado con rosquillas de alfajor y huevos frescos: todo se le hace duro y malo”.*

La conservación de los alimentos mediante salazón es un proceso ya conocido desde las civilizaciones primitivas. En 2005, se publicó un trabajo (Flad y col., 2005) en el que, mediante análisis de fluorescencia y difracción de rayos X, junto a microscopía electrónica de barrido, se demostraba que hacia el año 2.000 a. de C. en Zhongba, (China Central) se utilizaba sal como elemento de primera necesidad, incluso se ha dicho que los antiguos emperadores chinos monopolizaban el comercio de la sal y la utilizaban como impuesto (moneda de cambio) que gravaba las compras que realizaba la población. Los jeroglíficos egipcios nos revelan que en el antiguo Egipto (probablemente más de 2.000 a. de C.), aparte de ser un componente del natrón utilizado en la momificación, se usaba la sal para conservar alimentos (sobre todo el pescado que capturaban en el Mediterráneo y Nilo y la carne que dio lugar al plato denominado “*bottarga*”), a veces mezclada con vinagre (el *oxalme*, empleado posteriormente por los romanos). Los romanos heredaron todo el conocimiento que se tenía de la sal de las civilizaciones anteriores (asiáticas, griegas, egipcias) y de los celtas aprendieron a salazonar jamón y otros productos del cerdo, y en algunos puntos como Hispania se salaban ya pernils (López de Munain, 2013).

Según la Orden de 5 de noviembre de 1981, por la que se aprueba la norma de calidad para lomo adobado de cerdo, y el RD 474/2014, de 13 de junio de 2014, por la que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos, el adobado se podrá aplicar a todos “*los productos elaborados con la pieza del paquete muscular que tiene como base el músculo longissimus dorsii del cerdo, o con un solo trozo de dicha pieza, libre de tendones, sometido a la acción de la sal, adicionada o no de especias y condimentos, que puede incorporarse mediante inyección en la pieza cárnica, que le confieran un aspecto y sabor característico, con consistencia firme y compacta al tacto y forma cilíndrica más o menos regular o ligeramente aplanada*”.

Existen diversas formas de elaborar la cinta de lomo adobada que derivan, unas, de tradiciones locales (adición de los ingredientes), y otras, de avances tecnológicos, pero en esencia pueden encuadrarse en tres modalidades:

- salmuera concentrada con posterior desalado de las piezas,
- nitrificación por inmersión sin agregar sal que se añadirá en el adobo a razón de 15 g por kilo de peso de cada pieza, e
- inyección mecánica de la salmuera.

En cualquier caso, es necesario asegurar que los ingredientes penetran en el interior de la pieza. El descenso de la a_w es muy reducido y, aunque colabora con la nitrificación en la inhibición de la microbiota presente, la extensión de la vida útil respecto al producto fresco es muy exigua. Por ello, se requiere distribuir el lomo adobado bajo refrigeración. Una de las funciones del adobo es mantener o aumentar la CRA de la carne, merced a algunos de sus componentes, como el cloruro sódico, los lactatos, cloruro de calcio y los fosfatos, los cuales también mejoran el rendimiento al cocinarse (fritura, plancha, etc.), y potencian la palatabilidad de la textura de la carne (Lawrence y col., 2003; Davis y col., 2004; Sheard y Tali, 2004).

Ya se ha comentado la versatilidad de la sal en general. En Tecnología de los Alimentos desempeña varias funciones y proporciona algunas propiedades funcionales a la carne. Como agente bacteriostático, aumenta la vida útil de la carne y productos cárnicos al inhibir el crecimiento de bacterias alterantes (Maca y col., 1999; O'connor y col., 1993), de forma particular el de las aerobias Gram negativas (principales agentes alterantes de la carne fresca refrigerada), muy sensibles a los descensos de la a_w (Leistner y Rödel, 1976a; Gould, 1989). Asimismo, la sal activa las proteínas favoreciendo la hidratación y la CRA

al potenciar la interacción con las proteínas del producto, que puede incluso aumentar dos veces su tamaño original (O'Connor y col., 1993). El cloruro sódico también mejora la textura (Ellegner, 1972; Terrell, 1983) y la palatabilidad (McGee y col., 2003) aumentando su jugosidad (Sheard y col., 1999), lo que intensifica la aceptabilidad general (Jones y col., 1987; Smith y col., 1984). Los polifosfatos (sobre todo pirofosfato y trifosfato) ocasionan un aumento del pH, desplazando hacia la zona básica el punto isoeléctrico de las proteínas (Offer y Trinick, 1983). La adición de bicarbonato sódico reduce las pérdidas por goteo (Kauffman y col., 1998; Wynveen y col., 2001), mejorando así el rendimiento de la carne (Sheard y Tali, 2004) y, además, enmascara sabores problemáticos de la carne de cerdo (Sindelar y col., 2003). La adición de lactato de sodio potencia el color y lo estabiliza durante el almacenamiento (Carpenter y col., 1961; Krause y col., 1978; Banks y col., 1998). Además, ocasiona un aumento del rendimiento durante el cocinado, mejora la palatabilidad y colabora con la sal y otros solutos en la reducción de la a_w (Papadopoulos y col., 1991; Vote y col., 2000). Todas estas acciones van dirigidas a la consecución de un producto final lo más apetecible posible para los consumidores y, de hecho, el consumidor prefiere una carne más tierna y está dispuesto a adquirirla a mayor precio (Boleman y col., 1997).

1.7 PROPIEDADES SENSORIALES Y TEXTURA DE LA CARNE

Uno de los objetivos principales de la Tecnología de los Alimentos es el suministro a la sociedad de alimentos nutritivos y seguros, con una vida útil adecuada para el uso que se espera de los mismos, pero además pretende satisfacer la necesidad psicológica del hombre de disponer de una gran diversidad de alimentos para no caer en la rutina. Para ello, se aplican diversas operaciones para transformar los alimentos originales (la materia prima) en productos derivados que, muchas veces, vagamente recuerdan el material del que se partió, pudiéndose mencionar, como caso más paradigmático, ciertos tipos de quesos de propiedades sensoriales muy alejadas de la leche de procedencia. La Tecnología de los Alimentos dispone de diversos métodos para conseguir los objetivos anteriores, pero de nada vale lograr la meta si el producto final no es aceptado por el consumidor; a buen seguro que, independientemente de su seguridad y valor nutritivo, será rechazado si sensorialmente no le parece apetecible. De hecho, son numerosos los productos alimenticios nuevos que aparecen con frecuencia y, merced a su promoción publicitaria, mediatizan a la audiencia para la adquisición del nuevo alimento pero, pasada la presión de

los medios sociales, la mayoría desaparece del mercado permaneciendo en él los que realmente han sido del beneplácito de los consumidores. Los atributos sensoriales adquieren, pues, una gran importancia en la aceptación de la gran diversidad de alimentos que actualmente se pueden encontrar en el mercado.

1.7.1 Color

El color de la carne es el primer atributo que valora el consumidor en el momento de su adquisición, ya que lo asocia con la calidad y el grado de frescura de la misma, lo que en la distribución actual constituye un factor crítico, dado que la elección del producto ya envasado ha de hacerse visualmente. Los cambios de color son, por tanto, uno de los factores que determinan la retirada y renovación de las piezas cárnicas de las vitrinas refrigeradas de los locales de distribución.

A pesar de que las hemoproteínas sólo constituyen aproximadamente el 0,5% del peso de las carnes más rojas (como la de ovino o vacuno) y aún menos en las carnes más blancas (como la de cerdo) donde la Mb (denominada también como desoximioglobina, Mb propiamente dicha o simplemente Mb reducida) sólo alcanza alrededor del 0,044% a los 7 meses (Lawrie y col., 1963), tienen gran importancia para la aceptación de la carne por el consumidor debido a que son responsables del color de la misma. Además, las hemoproteínas influyen en el valor nutritivo (aportan hierro hemo).

La Mb es la hemoproteína característica del músculo, se considera la responsable del color de la carne, mientras que la hemoglobina (Hb), abundante en la sangre, desempeña un papel secundario en este sentido, ya que la mayor parte se ha eliminado en la sangría tras el sacrificio del animal. En condiciones normales, cuando la sangría del animal es adecuada, la Hb supone menos de un 10% de las hemoproteínas presentes en la carne de ganado vacuno. La carne contiene también concentraciones muy bajas de otras proteínas del grupo hemo (grupo prostético de la Mb), como los citocromos, cuya contribución al color es despreciable, sólo tienen un pequeño efecto en circunstancias muy especiales, como en la carne curada. La Mb está distribuida uniformemente por el músculo y, en vida del animal, su función es facilitar la difusión de oxígeno desde los capilares hasta las estructuras intracelulares donde participa en procesos oxidativos.

Las características de la absorción de la Mb en la zona visible del espectro electromagnético dependen de la configuración electrónica del grupo hemo, que a su vez

depende del sistema de dobles enlaces conjugados constituidos por los puentes meténicos y los cuatro grupos pirrólicos de la protoporfirina IX, y de la configuración electrónica del átomo de hierro que ocupa la posición central de la protoporfirina IX en el grupo hemo.

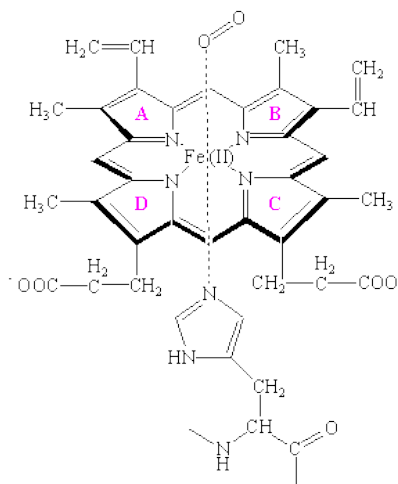


Figura 1.4 Estructura simplificada de la Mb

La Mb es una proteína globular de pequeño tamaño (PM 17.800 daltons) con un grupo hemo en el que el átomo de hierro (Figura 1.4) tiene cuatro posiciones ligadas a los átomos de nitrógeno del anillo tetrapirrólico de la porfirina. El hierro puede formar otros dos enlaces, uno a cada lado del plano; se denominan quinta y sexta posición de coordinación. El quinto ligando está unido al átomo de nitrógeno localizado en el grupo imidazol del resto de histidina proximal de la globina (grupo proteico de la Mb que es un polipéptido de 153 restos de aminoácidos) y la sexta posición de coordinación se encuentra dispuesta para aceptar cualquier compuesto de pequeño tamaño molecular que tenga la conformación electrónica adecuada para poder interaccionar con la molécula. Concretamente, la naturaleza de este sexto ligando y el estado de oxidación del átomo de hierro son los responsables de la distribución electrónica de la capa exterior del hierro del grupo hemo y, en definitiva, del color que presenta la carne en un determinado momento bajo distintas condiciones del entorno. Cuando el átomo de hierro se encuentra en forma reducida (Fe^{2+}), la sexta posición de coordinación de dicho átomo puede estar ocupada por ligandos como O_2 , NO , CO o CN^- que crean un campo electrostático fuerte formándose un enlace de carácter covalente.

Color de la carne fresca

En el músculo, el hierro se encuentra en la Mb en forma reducida (ión ferroso), y así se encuentra también en el espesor de una pieza de carne fresca. Si el grupo hemo tiene asociada una molécula de oxígeno, se forma la oximioglobina (OxiMb), de color rojo brillante, que es el que se observa en la parte exterior de la carne y es el más apetecible por el consumidor. Esto es lo que ocurre cuando la carne, al hacer un corte, se expone al aire unos minutos, ya que el oxígeno difunde por el medio acuoso que supone la carne y, dada la gran afinidad de la Mb por el oxígeno, éste ocupa rápidamente, y de forma reversible, la sexta posición de coordinación del átomo de hierro. En el interior de la carne, la sexta posición de coordinación de la Mb no tiene oxígeno, presentando un color rojo púrpura menos brillante que el de la OxiMb. Estas dos formas son interconvertibles, dependiendo de la presión parcial de oxígeno y, en la práctica, de la superficie de contacto (Figura 1.5).

El color de la carne fresca es de la Mb y cuando se expone al aire adquiere el de la OxiMb, pero el oxígeno la va transformando en metamioglobina (MetMb) y durante un tiempo se reduce a Mb merced a un sistema enzimático endógeno pero, cuando éste se desactiva, el pigmento pasa a un estado oxidado (MetMb) permanente, indicio de una carne poco reciente, aunque puede que aún no esté alterada desde el punto de vista microbiológico.

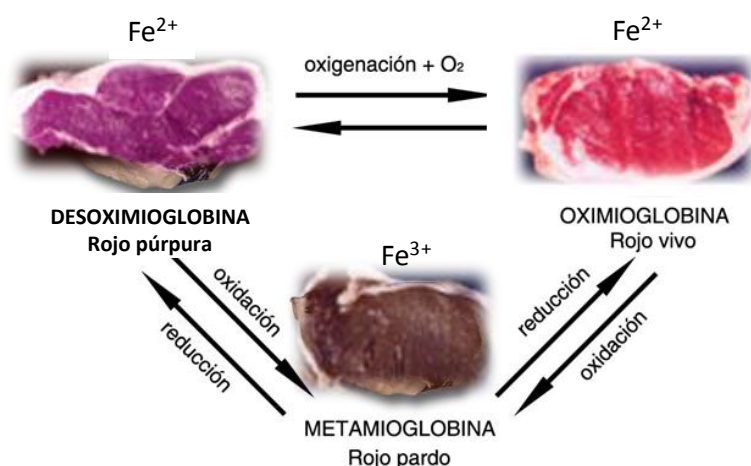


Figura 1.5 Estados de oxidación-reducción de la Mb y repercusiones en el color de la carne

1.7.2 Olor y sabor de la carne

Puede decirse que, durante el consumo de un determinado producto, el sabor y el aroma son las características sensoriales que más satisfacen al consumidor sin olvidar la sensación de la textura en la cavidad bucal. El sabor y el aroma de la carne son propiedades de naturaleza extremadamente compleja e íntimamente relacionadas entre sí. El término anglosajón *flavor*, (aunque en el diccionario de la RAE no existe el término *flavor*, se utiliza frecuentemente en textos traducidos o específicos de la temática y así se hará en esta memoria), se utiliza para designar conjuntamente la percepción de ambas, unidas a las sensaciones táctiles. Las percepciones olfatorias se originan en la nariz por excitación de los receptores nerviosos de la glándula pituitaria de las fosas nasales. Se considera olor a la sensación percibida durante la inspiración del aire por la nariz. El *flavor*, sin embargo, se percibe en el momento de la introducción del alimento en la boca, durante la masticación, y durante y después de la deglución (Patterson, 1975). En la boca, las sustancias volátiles se liberan y se disuelven en la mucosa de la faringe y el velo del paladar, ascendiendo a los centros sensores del olfato vía retronasal. El *flavor* es una propiedad de muy difícil determinación ya que incluye diversas sensaciones, como sabor, olor, tacto, textura, palatabilidad, temperatura, e incluso sonoras (Ordóñez y col., 1998). Las percepciones gustativas corresponden a las sensaciones del gusto y se originan en las mucosas de la lengua, de la cavidad bucal y del paladar.

La carne cruda, presenta un sabor característico que se ha descrito como “a suero” o “ácido láctico comercial” (Cross y col., 1986), ligeramente salino, parecido al de la sangre, y un aroma poco marcado. Es después del tratamiento térmico cuando la carne desarrolla su plenitud sensorial. Los precursores del sabor de la carne incluyen compuestos volátiles y no volátiles. En general, los precursores esenciales del sabor a carne, independientemente de la especie, son compuestos no volátiles, solubles en agua y de bajo peso molecular (aminoácidos, péptidos, algunos ácidos orgánicos, azúcares, metabolitos de nucleótidos, tiamina y lípidos). Además, independientemente del origen de la carne, cuando ésta se almacena y calienta, se van a producir compuestos derivados de procesos complejos (glicolisis, proteolisis, lipolisis, oxidaciones o pirolisis, interacciones entre los productos resultantes de cada vía, etc.) responsables de matices sápidos tanto deseables como no deseables. La autooxidación de los lípidos es la principal causa del desarrollo de sabores

extraños y desagradables en las carnes cocinadas y recalentadas que Tims y Watts (1958) acuñaron como *warmed over flavour*.

Sin embargo, los compuestos volátiles son responsables del aroma de la carne, originando una gran variedad de diferentes sensaciones de olor. Derivan principalmente de carbohidratos, grasas y proteínas, siendo los de origen lipídico (productos de oxidación y degradación de los lípidos) los que principalmente confieren el aroma específico de cada especie (Shahidi, 2002). También juegan un importante papel en este atributo sensorial los compuestos azufrados, los cuales se forman probablemente por reacción entre compuestos carbonilos, SH_2 y NH_3 .

El sabor y el olor de una determinada carne están íntimamente relacionados con su color. Así, una carne muy pálida generalmente tiene muy poco sabor, y al contrario (Carballo y López de Torre, 1991). Por otra parte, también se ha observado que la carne de los animales de más edad ofrece un olor más fuerte que la de animales más jóvenes de la misma especie (Miller, 1994).

En definitiva, las características sensoriales finales de un producto cárnico dependen del tipo y de la proporción de precursores presentes en la materia prima, de los ingredientes que se añaden en la elaboración, así como de la forma en que el procesado o cocinado afecte a los componentes de la carne. Por otra parte, es necesario mencionar la importancia que tienen los potenciadores y sinergistas en el desarrollo de dichas propiedades. Se trata de compuestos que refuerzan el sabor o el aroma de otros y su efecto se manifiesta incluso en mínimas cantidades.

1.7.3 Textura de la carne

La textura es otra de las características sensoriales de la carne más apreciadas por el consumidor (Issanchou, 1996; Miller y col., 2001). La textura engloba todas las propiedades relacionadas con la estructura. Szczesniak (2002) la define como “...la manifestación sensorial y funcional de las propiedades estructurales, mecánicas y superficiales de los alimentos determinadas a través de los sentidos de la vista, oído, tacto y las cinéticas implicadas en cada caso”. No puede hablarse de «la textura de un alimento» como si fuera una característica aislada del mismo, sino que hay que referirse a los atributos de textura, o las características o propiedades de textura (Kramer, 1964). En este contexto, se habla de textura para referenciar los atributos mecánicos y superficiales de un producto, perceptibles mediante receptores mecánicos, táctiles y, si es conveniente,

visuales y auditivos (ISO 5492-1992). Trata de la percepción del producto y cómo éste se comporta al ser manipulado e ingerido.

El ser humano percibe la textura mediante varios sentidos, entre los que destaca el tacto a través de la presión. No obstante, existen instrumentos mecánicos para medir la textura que pueden detectar y cuantificar ciertos parámetros físicos que deben posteriormente interpretarse adecuadamente para relacionarlos con la percepción sensorial. En este caso, la percepción de la textura se deriva de la respuesta del alimento a un estrés aplicado que se cuantifica mediante propiedades mecánicas, como dureza, firmeza, adhesividad, cohesividad, masticabilidad, elasticidad o viscosidad (Meilgaard y col., 1999).

De acuerdo a la definición de textura, puede observarse que ésta juega un papel importante en la aceptación global de un producto, superando, en muchos casos, a la apariencia, el olor, el sabor y la composición nutricional (Bourne, 2002). De hecho, es uno de los criterios más importantes utilizados por los consumidores para evaluar la calidad de los alimentos y, en muchos casos, se prefieren productos en los que exista un cierto contraste en las texturas, lo cual aumenta el placer de comer proporcionando interés y variedad (Carpenter y col., 2002). Dentro de los atributos mencionados, la dureza adquiere especial relevancia en la carne. Está relacionada fundamentalmente con el contenido de tejido conectivo y con el estado de contracción en el que se encuentran las fibras musculares (Koochmaraie y Geesink, 2006). Al referirse a este tejido, se incluyen fibras de colágeno y, en mucha menor proporción, fibras de elastina y reticulina. Todos aquellos factores que aumenten la estabilidad y resistencia de estas estructuras favorecerán la dureza. En general, el mayor contenido en tejido conectivo se asocia a una mayor dureza pero, paradójicamente, las carnes de animales más viejos tienen un menor contenido de colágeno que las de los jóvenes pero, sin embargo, son más duras, lo que se debe a que el número de entrecruzamientos va incrementando con la edad.

Las variaciones de la dureza de la carne derivadas del estado de las miofibrillas dependen del grado de interacción actina-miosina y de la extensión de la zona del sarcómero que no interacciona con las proteínas. Cuanto mayor sea el número de interacciones entre la actina y la miosina, mayor será la dureza; por el contrario, cuanto mayor sea la zona del sarcómero sin interacciones, menor será. También pueden contribuir a la dureza de la carne las enzimas proteolíticas, que digieren parcialmente algunas

proteínas miofibrilares, ocasionando cambios en la textura durante el almacenamiento (Penny, 1984). Por otra parte, la contribución relativa de cada uno de estos factores en el grado de dureza depende del músculo considerado. Así, la longitud del sarcómero es el factor principal que determina la terneza del músculo *psoas major*, la proteólisis la del *longissimus dorsi* y el tejido conectivo la de otros músculos como el *semimembranosus* y el *biceps femoris* (Koochmaraie y col., 2002).

Para Dransfield y col. (1984), la textura lleva consigo dos componentes principales: terneza y jugosidad. La terneza es la cualidad de la carne de poderse cortar y masticar con mayor o menor facilidad antes de la deglución, estando directamente ligada a la resistencia mecánica del producto. El caso contrario sería la dureza, definida como la propiedad de la textura manifestada por una alta y persistente resistencia a la rotura (Jowitt, 1974). Además, se relaciona de forma indirecta con la jugosidad de la carne, de forma que generalmente se considera que las carnes menos jugosas son más duras. Para Weir (1960), la textura de la carne resulta de la suma de tres factores: facilidad de penetración de los dientes en la carne al inicio de la masticación, facilidad de fragmentación de la carne y cantidad de residuo que queda en la cavidad bucal concluida la masticación. La firmeza de la carne puede definirse como la resistencia a la deformación de una porción de carne al intentar fragmentarla con los dientes.

La grasa intramuscular, el pH y la CRA son factores que influyen indirectamente en la textura de la carne. Wood y col. (2003) indicaron que los lípidos neutros que se encuentran en los adipocitos del perimisio podrían producir un ablandamiento de la carne al separar los haces de las fibras musculares. Respecto a la CRA, se define como la propiedad o aptitud de la carne para mantener el agua durante su manipulación, así como para incorporar y retener el agua añadida durante el procesado (Offer y Knight, 1988). La CRA contribuye a la jugosidad de la carne y facilita la disgregación de la estructura muscular. La carne cruda de mamíferos presenta, tras el sacrificio, un 75% de agua, aproximadamente (Lawrie, 1991). Al manipular la carne, se producen pérdidas que pueden incluso superar el 40% (Offer y Knight, 1988). Esta liberación de agua (*post mortem*) depende del estado de contracción de las proteínas contráctiles (sarcómeros contraídos, fibrillas o fibras) que tiene lugar en la instauración del *rigor mortis*, por cambios en la permeabilidad de la membrana celular y por la reducción del espacio existente entre miofibrillas y miofilamentos (Hönikel y col., 1986). El músculo se contrae liberándose agua a través de

las superficies de corte (Sierra, 1973). Esta pérdida de agua también depende del pH de la carne y del grado de desnaturalización de las proteínas.

1.8 ALTERACIÓN DE LA CARNE

El término “alteración” (o “deterioro”) de la carne hace referencia a los cambios que experimenta en las propiedades que la caracterizan hasta convertirse en un material inadecuado para el consumo humano. Entre las alteraciones de la carne se encuentran defectos en el color, cambios en la textura, desarrollo de malos sabores, olores y limo. El que se dé una u otra alteración o varias de forma simultánea depende fundamentalmente del músculo en cuestión, de la microbiota presente, de las manipulaciones durante su procesado y de las condiciones de almacenamiento (temperatura, atmósfera, etc.). Entre los distintos agentes (físicos, químicos y biológicos) que pueden ocasionar la alteración de este alimento, el más importante en el caso de la carne fresca es, sin lugar a dudas, el crecimiento de los microorganismos que alcanzan el producto.

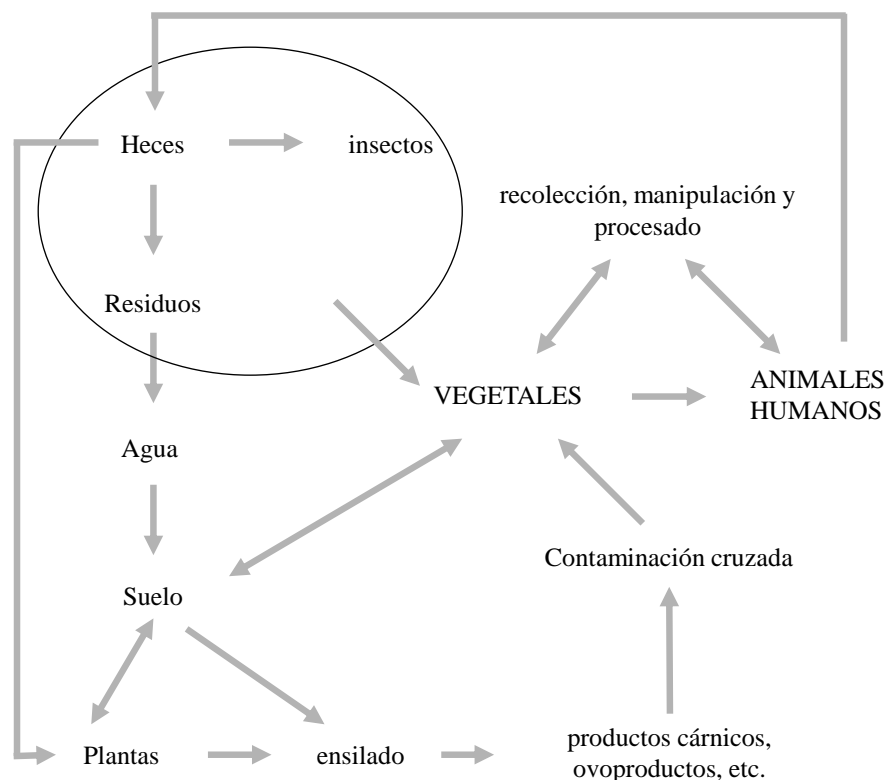


Figura 1.6 Distintos agentes (físicos, químicos y biológicos) que pueden ocasionar la alteración de la carne

Entre los **microorganismos** presentes en la carne, se distinguen los que proceden del animal vivo y los que corresponden a una contaminación posterior al sacrificio incluyendo

la contaminación cruzada (Jackson y col., 2001). Respecto al primer tipo de contaminación, se asume, de forma general, que la masa interna del músculo de animales sanos no contiene microorganismos o éstos son muy escasos (Gill, 1979). Determinados factores, como el estrés y el contacto entre los animales y con materia fecal durante el transporte al matadero (Glaser y Kiecolt-Glaser, 2005), así como el reposo prolongado antes del sacrificio (Johnston, 2000), favorecen la diseminación de microorganismos patógenos. Sin embargo, la contaminación de la carne tiene lugar habitualmente durante el sacrificio, faenado y operaciones posteriores. Si éstas no se realizan de forma adecuada y en un periodo de tiempo relativamente corto, pueden llegar a la carne gran cantidad de microorganismos procedentes tanto del tracto intestinal, piel y aparato respiratorio del animal (ICMSF, 2005), como del entorno (heces, suelo, agua, polvo, pienso, cajas de embalaje y almacenamiento, manipuladores, etc.). Así, si la evisceración no se lleva a cabo de forma inmediata, los microorganismos propios del aparato digestivo pueden contaminar las zonas adyacentes. Los cuchillos, paños, manos y ropa del personal pueden actuar como intermediarios de la contaminación durante el desuello, evisceración, despiece, etc. La manipulación tras el despiece puede aportar también microorganismos a la carne a partir de carretillas, cajas, otras carnes contaminadas, etc. En la venta al por menor y en el propio hogar, suelen producirse contaminaciones a partir de tajos, cuchillos, encimeras, mesas, recipientes, etc. Por todo ello, después de la carnización es muy importante mantener una estricta higiene y la cadena de frío durante todas las etapas de la comercialización.

Una vez que los microorganismos han alcanzado la superficie de la carne, encuentran un medio muy adecuado para su multiplicación debido a que disponen de los nutrientes necesarios para su crecimiento. Además, los valores típicos de pH (5,4-5,6) y a_w (0,98-0,99) de la carne fresca son favorables para el desarrollo de una gran diversidad de microorganismos. Aunque el potencial de óxido-reducción en la superficie de la carne suele ser ligeramente positivo, en el interior reinan condiciones reductoras. De esta forma, los microorganismos aerobios prevalecerán en la superficie, mientras que los anaerobios, si han alcanzado el espesor de la carne, pueden desarrollarse en el interior del músculo, tanto si son anaerobios facultativos o estrictos.

Debido a la gran variedad de fuentes de contaminación, son muchos los microorganismos que pueden alcanzar la carne. Entre las bacterias, cabe citar (Jay, 2000) a miembros de los géneros *Pseudomonas*, principales responsables de la alteración de la carne almacenada en refrigeración (Ayres, 1960a; Splittstoesser, 1976; Molin y Terntrom,

1982, 1986; Gill, 1986; Molin y col., 1986; Kraft, 1986, 1992; Greer, 1989; Lebert y col., 1998; Steihauserova, 2000), *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Streptomyces*. Entre los mohos, se han aislado representantes de los géneros *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Monilia*, entre otros. *Candida*, *Torula*, *Rodotorula* o *Torulopsis* son las levaduras más frecuentes (Jay, 2000). El desarrollo de unos u otros tipos y, en consecuencia, el modelo de alteración viene determinado por factores como la especie, número y distribución de los microorganismos contaminantes, relación superficie/volumen de la carne, grado de deshidratación superficial, disponibilidad de oxígeno, temperatura, etc.

La temperatura del entorno influye de forma decisiva en la alteración de la carne. A temperatura ambiente se desarrollan microorganismos mesófilos, como las bacterias coliformes, *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp., estos últimos principales responsables de la putrefacción. Sin embargo, este fenómeno es muy improbable a temperaturas de refrigeración, debido a que sólo pueden crecer microorganismos psicrotrofos y psicrófilos (Frazier y Westhoff, 1985). La alteración de la carne a temperatura ambiente (25-40 °C) cursa con fenómenos putrefactivos (olores repugnantes, producción de gas, textura esponjosa, etc.), siendo los microorganismos habitualmente responsables diversas especies del género *Clostridium*, como *C. histolyticum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes* o *C. oedematiens* (Rosset, 1982). En cualquier caso, la putrefacción de la carne fue de gran importancia tiempos atrás, antes de implantar de forma generalizada la refrigeración.

A temperaturas intermedias (10-25 °C), los tipos de alteraciones más comunes que pueden presentarse son la denominada “hueso hediondo” y una alteración superficial debida a microorganismos mesófilos que se instalan en la carne. La primera es típica de grandes piezas musculares cercanas a las articulaciones. Externamente apenas se manifiesta, pero al corte emanan fuertes olores ácidos, característicos de ácidos grasos de cadena corta (principalmente fórmico, acético, propiónico y butírico) y larga (por ejemplo, láurico o mirístico) y a ácidos orgánicos (láctico y succínico, entre otros). A estos olores pueden contribuir también enzimas hidrolíticos del tejido afectado y un cierto grado de proteolisis por parte de bacterias anaerobias facultativas o estrictas. Se han aislado diferentes especies de los géneros *Clostridium* y *Bacillus* (Ingram y Dainty, 1971) y enterobacterias, como *Proteus vulgaris* (Simonetti y col., 1983) y *Serratia liquefaciens* (Hechelmann, 1986).

En la alteración superficial se desarrolla, de forma simultánea, una microbiota compuesta por bacterias aerobias o anaerobias facultativas, favorecidas por la intensa actividad respiratoria de los tejidos (Ingram y Dainty, 1971). Los modelos de alteración son muy diversos dependiendo de las especies microbianas que prevalezcan.

De forma general, puede decirse que actualmente la totalidad de la carne fresca se somete a refrigeración, por lo que los tipos de alteraciones antes mencionados han dejado de ser un suceso corriente. No se va a insistir más en las mismas. Sin embargo, parece oportuno relatar detalladamente la alteración de la carne refrigerada, lo que se realizará más adelante, en el apartado 1.11.2, cuando se describa la refrigeración de la carne.

Otro aspecto de la aceptabilidad de la carne por el consumidor es su **color**. Realmente, su deterioro no es una verdadera alteración, pero si presenta un color parduzco, debido a la acumulación de MetMb, puede provocar el rechazo de la carne, ya que normalmente es indicativo de poco fresco y puede asociarse a su alteración. La oxidación de la Mb es máxima a tensiones de oxígeno que corresponden a $7,5 \pm 3$ mm de Hg a 7 °C (George y Stratmann, 1952; Brown y Mebine, 1969), equivalente a un porcentaje algo menor del 2% de oxígeno en la atmósfera del entorno, mientras que a tensiones superiores a los 30 mm de Hg (4% de O₂ a 1 atm. de presión), la velocidad de oxidación es independiente de la tensión de oxígeno.

De forma simultánea a la oxidación, un sistema reductor de naturaleza enzimática (metamioglobin-reductasa) existente en el músculo, reduce el Fe³⁺ de la MetMb a su estado ferroso (Kuma e Inomata, 1972; Bolyai y col., 1972; Giddings, 1974). Por tanto, cuando la carne se almacena en las condiciones habituales (en aire), se produce inicialmente un aumento de la concentración de MetMb hasta que se alcanza un pseudoequilibrio entre la oxidación y la reducción. Este equilibrio se mantiene cierto tiempo, pero finalmente el sistema enzimático reductor acaba desactivándose y se rompe el equilibrio a favor de la oxidación. Es este nada atractivo color pardo de la MetMb el que microscópicamente revela la oxidación de la Mb; el consumidor rechaza la carne y la asocia con un producto alterado.

La concentración de MetMb a la que se alcanza ese equilibrio entre la oxidación y la reducción depende, por una parte, de los factores que determinan la velocidad de oxidación de la Mb y la actividad del sistema reductor de la Mb. Por ejemplo, en los músculos cuyo pH final es bajo, la aparición del color pardo de la MetMb es más rápida que en los de pH

final alto (Owen y Lawrie, 1975) debido a que la velocidad de oxidación de la Mb aumenta al disminuir el pH, al tiempo que se reduce también el rendimiento del sistema reductor enzimático. La temperatura tiene mayor influencia en la oxidación de la Mb (Brown y Mebine, 1969) que en la reducción enzimática (Hagler y col., 1979), de forma que un aumento de 3 a 5 °C duplica la velocidad de transformación de Mb en MetMb (Taylor y McDougall, 1973).

La velocidad de oxidación de la Mb depende también de otros factores. Uno de ellos es el músculo de que se trate; el *longissimus dorsi* y el *semitendinosus* se oxidan más lentamente que otros y, en consecuencia, los primeros presentan el color púrpura de la Mb durante un tiempo más largo que, por ejemplo, el *psaos major*, que se oxida rápidamente (Ledward, 1971; McDougall y Taylor, 1975). Otros factores que influyen en la oxidación de la Mb es la presencia de iones Cu^{2+} o Fe^{3+} (Synder y Skrdlant, 1966), el picado de la carne, que minimiza la actividad del sistema reductor endógeno (Ledward y col., 1977), la radiación ultravioleta, la humedad relativa y la carga microbiana (Ledward, 1984).

1.9 MICROORGANISMOS PATÓGENOS QUE POTENCIALMENTE PUEDEN CONTAMINAR LA CARNE

Como se ha indicado anteriormente, el interior del músculo del animal sano está en principio exento de microorganismos. La contaminación se produce durante el sacrificio y en las etapas posteriores. Si el animal está enfermo, los agentes etiológicos pueden pasar al animal y después a la carne. Por ejemplo, si una hembra padece mastitis no es difícil suponer que el estafilococo o el estreptococo (u otro microorganismo productor de esta enfermedad) pueda, vía sanguínea, alcanzar la fracción muscular. Por otra parte, muchos microorganismos patógenos son ubicuos (por ejemplo, salmonelas y listerias) y vehiculados por el agua, aire y manipuladores, pueden contaminar la carne.

Se ha informado (EFSA, 2013) que el alimento más frecuentemente implicado en las toxiinfecciones alimentarias es la carne, siendo responsable, aproximadamente, del 75% de los casos en los que el alimento se ha identificado como fuente del brote. En concreto, la carne de cerdo se asocia a numerosos patógenos, siendo responsable en el año 2011 de 449.322 casos de enfermedades en el hombre, con 4.334 hospitalizaciones y 201 muertes (EFSA, 2013).

Entre los patógenos que pueden contaminar la carne, hay que destacar en primer lugar *Listeria monocytogenes*, no porque sea el de mayor potencial patógeno sino porque en el contexto de esta tesis es la bacteria “diana” que hay que controlar. Por ello, se hablará en profundidad más adelante (apartado 1.10 y siguientes). Baste mencionar ahora que es un microorganismo ubicuo, ampliamente distribuido en el ambiente, suelo, agua y material vegetal en descomposición. Del resto de microorganismos patógenos sólo se hará una breve reseña, sobre todo referida a su incidencia en la carne.

Salmonella, cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal del hombre y animales, aunque se ha aislado en una gran diversidad de materiales, tanto relacionados con los alimentos como ajenos a ellos. El crecimiento de este microorganismo en un determinado sustrato depende de las condiciones microecológicas del mismo, pudiendo sobrevivir durante semanas e incluso años en agua y suelo, respectivamente, en condiciones favorables de temperatura, humedad y pH (Todar, 2006). Su incidencia en canales de diferentes especies es muy variable aunque, en general, se sitúa en niveles del orden del 1% (ICMSF, 2005). Su prevalencia en carne fresca está relacionada con la colonización del animal vivo, la suciedad externa (en pelo, lana, plumas, etc.) y la higiene durante el sacrificio.

La importancia clínica del género *Salmonella* se debe a su capacidad de producir infecciones intestinales y/o sistémicas en el hombre y en los animales, conocidas como salmonelosis y constituye la principal causa de toxiinfecciones alimentarias en el hombre. Según los últimos datos publicados por la EFSA (2015), en el año 2013, al igual que en los años anteriores, los serovares Enteritidis y Typhimurium de *S. enterica* fueron los principalmente asociados a la enfermedad en el hombre en la Unión Europea, habiéndose relacionado el primer serovar, sobre todo, al consumo de huevos y ovoproductos (59,9% de los brotes confirmados) y *S. Typhimurium* con el de carne de cerdo y derivados (46,7%). En España, representa el 80% de los casos de enfermedades transmitidas por alimentos.

Escherichia coli, siendo el serotipo de mayor relevancia el O157:H7. La gravedad de los síndromes que ocasiona y su baja dosis infectiva (inferior a 100 células) le sitúan entre los agentes de infecciones alimentarias más preocupantes. *E. coli* se encuentra en el tracto digestivo del hombre y otros vertebrados. Los vehículos de transmisión más frecuentes son los productos cárnicos y la leche no pasteurizada, aunque se ha informado (Chen y Durst,

2006) que también se transmite por aves de corral, vegetales, bocadillos fríos y agua de bebida o baño.

Staphylococcus aureus. Se encuentra ampliamente distribuido en el agua, suelo, polvo, y equipos de procesamiento de los mismos, en casi todas las superficies, en humanos y en los animales, de donde puede pasar a los alimentos. Una vez en el alimento, se multiplican rápidamente entre 20 y 37 °C. Su carácter patógeno proviene de las enterotoxinas que produce.

Yersinia enterocolitica. Se ha aislado de numerosos alimentos, aunque sólo un pequeño número de cepas producen infección en humanos (Swaminathan y col., 1982). La principal fuente de dicho microorganismo la constituye el cerdo, el cual puede ser portador de diversos serotipos patógenos específicos, habiéndose señalado que el 25% de las canales porcinas estaban contaminadas con cepas patógenas para el hombre (Andersen, 1988).

Clostridium botulinum. Sus esporas están ampliamente distribuidas en diferentes medios. Los brotes de botulismo se asocian principalmente a la carne y productos cárnicos, a menudo sometidos a procesos térmicos domésticos.

Clostridium perfringens. Se ha aislado en una gran variedad de alimentos, predominando en las carnes crudas de mamíferos y de aves. De hecho, Smart y col. (1979) sugirieron que este microorganismo se encuentra en todas las canales comerciales de los animales de abasto, aunque en bajo número; resultados similares se obtuvieron en las canales de aves (Nakamura y Schulza, 1970).

Campylobacter spp. Los principales vehículos de infección en el hombre son la carne de ave y la leche contaminadas, aunque también se han aislado de la carne de cerdo. Existen dos especies de *Campylobacter* que originan toxiinfecciones alimentarias: *C. jejuni* y *C. coli*, responsables del 89-93% y del 7-10%, respectivamente, de los brotes de campilobacteriosis, siendo la carne de pollo el vehículo principalmente implicado (Opfer, 2008). En un estudio realizado por Lammerding y col. (1988), se observó que el 74% de los pavos y el 38% de los pollos estaban contaminados con *Campylobacter spp.*, bastante superior al 23% de la carne de vacuno y al 17% de la de cerdo. Se ha informado (Fricker y Park, 1989) que *C. jejuni* predomina en las muestras ambientales y de alimentos (>90%), y *C. coli* en la carne de cerdo (>95%).

Aeromonas hydrophila se ha detectado en carne de diversas especies de animales de abasto (Fricker y Tompsett, 1989), pero su hábitat más frecuente es el agua, pudiendo pasar a animales acuáticos.

Otras bacterias patógenas son agentes etiológicos de enfermedades de animales de abasto que en años anteriores adquirieron relevancia pero, debido a iniciativas sanitarias, unas prácticamente se han erradicado y la incidencia de otras se ha reducido de forma espectacular. Se podrían citar al respecto *Bacillus anthracis* y *Brucella* spp.

En el presente apartado parece oportuno mencionar dos especies de parásitos que adquieren relevancia, *Trichinella spiralis* y *Toxoplasma gondii*. Cuando se consume carne parasitada con *T. spiralis*, los quistes se incuban en el intestino y se convierten en nematodos adultos que después invaden el tejido muscular de varios órganos. *T. gondii* es un protozoo que puede producir abortos en mujeres gestantes y el niño, si llega a nacer, puede acarrear secuelas durante largo tiempo. Aunque la toxoplasmosis se asocia normalmente a gatos, el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) estima que aproximadamente un 50% de los casos son de origen alimentario (Scallan y col., 2011), habiéndose asociado a carne de cerdo y otros animales domésticos (Jones y col., 2009; EFSA, 2015).

1.10 *Listeria monocytogenes*

Esta bacteria se aisló por vez primera en 1926 (Murray y col., 1926) y, después de adjudicarles diversos nombres, Seeliger, en 1957, le asignó el de *Listeria* en honor a Joseph Lister (1827-1912), cirujano y microbiólogo precursor, junto a Koch y Pasteur, de la medicina antiséptica y preventiva.

El género *Listeria* está incluido en la familia *Listeriaceae*, integrada por bacterias Gram-positivas. Son bacilos cortos, regulares, no esporulados, en disposición individual o formando cadenas cortas. Las colonias son pequeñas (de 1-2 mm tras uno o dos días de incubación). Los microorganismos de este género son microaerófilos o anaerobios facultativos, catalasa positivos y oxidasa negativos. Las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas. Hidrolizan la esculina, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol ni SH₂. Producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares. El contenido de guanina-citosina de su ADN es bajo, entre el 36 y el 38%. Las especies de *Listeria* se identifican mediante técnicas de cultivo y reacciones bioquímicas (producción de ácido a

partir diversos azúcares) y su capacidad de producir hemólisis (ICMSF, 1996c; Rocourt y Cossart, 1997; Montville y Matthews 2005), característica esta última esencial para distinguir *L. monocytogenes* de *L. innocua*, que es la especie no patógena aislada con mayor frecuencia.

La clasificación del género *Listeria* es compleja. El número de especies y subespecies, así como sus nombres y posición dentro del árbol taxonómico, varían dependiendo de los investigadores. En la lista actualizada de nomenclatura de procariotas (LPSN, <http://www.bacterio.net/listeria.html>) figuran 19 especies y 6 subespecies, de las cuales, únicamente son patógenas *L. monocytogenes*, para el hombre (Broome y col., 1990; Bille, 1990) y *L. ivanovii* para rumiantes, aunque se ha aislado en contadas ocasiones del hombre.

1.10.1 Crecimiento y supervivencia

L. monocytogenes es una bacteria ubicua muy difundida en entornos medioambientales (Welshimer, 1960; Gray, 1963), habiéndose aislado del suelo y del ecosistema agrícola (McGowan y col., 1994), materia vegetal en putrefacción (Fenlon, 1986), aguas superficiales (Dijkstra, 1982) y residuales (Garrec y col., 2003), sistemas de depuración de agua (Al-Ghazali y Al-Azawi, 1990), ensilado (Ryser y col., 1997), de diferentes especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos (Weiss y Seeliger, 1975) y de una gran diversidad de matrices alimentarias que se mencionan más adelante, siendo extremadamente difícil conseguir la ausencia de *L. monocytogenes* en los productos finales en los que puede multiplicarse hasta niveles potencialmente peligrosos.

El crecimiento del microorganismo en los alimentos depende de las características intrínsecas (pH, a_w) y extrínsecas (temperatura de almacenamiento, humedad relativa, etc.) del producto y de las técnicas de procesado utilizadas en su elaboración (térmicas y no térmicas), por lo que para controlar su crecimiento es necesario conocer las condiciones y factores que afectan a su crecimiento y supervivencia. La temperatura óptima de crecimiento de *L. monocytogenes* se sitúa entre 30 y 35 °C, por lo que generalmente se considera bacteria mesófila. No obstante, puede multiplicarse desde -0,4 a 45 °C (Walker y col., 1990), con unos valores g de 43, 6,6 y 1,1 h a 4, 10 y 37 °C, respectivamente, y unas fases de latencia de 151, 48 y 7,3 h a las mismas temperaturas (Barbosa y col., 1994).

Respecto a su termorresistencia, cabe decir resumidamente que es relativamente elevada, mayor que la de muchos microorganismos no esporulados, incluidos patógenos como *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. (Mackey y Bratchell, 1989; Farber y Peterkin, 1991; Farber y col., 1998), y similar a la de otros que se consideran como los más termorresistentes dentro de los no esporulados, como los enterococos o sólo ligeramente inferior a la del patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. No obstante, la termorresistencia se ve afectada por factores intrínsecos del alimento (pH, a_w , sal, etc.).

En cuanto al pH, *L. monocytogenes* muestra un crecimiento óptimo a valores próximos a la neutralidad, deteniéndose a pHs inferiores a 4,1-4,4 y por encima de 9,6 (Lou y Yousef, 1999; Jay y col., 2009). Por otra parte, se ha constatado que los valores límites de pH pueden verse afectados por la composición del medio, la cepa en cuestión y la fase de crecimiento en que se encuentra la célula bacteriana. Así, durante la fase estacionaria se produce una mejor adaptación del microorganismo a valores bajos de pH (Giannuzzi, y Zaritzky, 1996).

La a_w óptima para su crecimiento es de 0,97 y la mínima se sitúa entre 0,90 y 0,93 (Farber y col., 1992; Miller, 1992), aunque varía con el soluto que se emplee para conseguirla, así con glicerol el valor límite es de 0,90 a 30 °C (Farber y col., 1992), mientras que con NaCl y sacarosa es de 0,92 y 0,93, respectivamente (ICMSF, 1996a). Por debajo de 0,90 no se ha observado crecimiento, aunque puede sobrevivir incluso a niveles de a_w de 0,83 (Swaminathan, 2001).

Los tres factores a los que se ha hecho referencia en los párrafos anteriores (temperatura, pH y a_w) son los que adquieren mayor relevancia en el crecimiento de *L. monocytogenes*, de forma que hay regulaciones microbiológicas que combinan los tres factores. Un ejemplo muy demostrativo es el de los valores que, aplicando el modelo de las “barreras” de Leistner (1992), establece el Reglamento de la Comisión Europea (CE1441/2007) en relación con la presencia de este microorganismo en alimentos refrigerados listos para el consumo (Tabla 1.5).

Tabla 1.5 Resumen del criterio microbiológico de la Unión Europea (CE 1441/2007) sobre la presencia de *Listeria monocytogenes* en productos listos para el consumo

		<u>Limite</u>
1. Automáticamente en productos RTE con:	a) $\text{pH} \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$ b) $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$ c) Vida útil < 5 días	100 ufc/cm ²
2. Productos RTE en los que puede crecer <i>Lm</i>	a) Si se puede demostrar que no superará el valor (100 ufc/cm ²)	100 ufc/cm ²
	b) Si no se puede demostrar que no superará el valor (100 ufc/cm ²) durante su vida útil	Ausencia/25 g
3. Productos RTE destinados a los lactantes y a usos médicos especiales		Ausencia/25 g

Por otra parte, es necesario indicar que se puede encontrar en superficies húmedas de los equipos industriales, lo que, unido a su facultad de multiplicarse en refrigeración, permite su presencia en frigoríficos y unidades de refrigeración (ICMSF, 1996b). Hay que tener en cuenta, además, la capacidad que presentan algunas especies de este género para adherirse a las superficies de las instalaciones y equipos formando biofilms, lo que les permite incrementar sus posibilidades de supervivencia en el medio ambiente. Como consecuencia, los métodos habituales de limpieza y desinfección se muestran a menudo ineficaces frente a las bacterias alojadas en los biofilms. Por ello, *L. monocytogenes* adquiere especial importancia en la industria alimentaria (Chae y Schraft, 2000; Carpentier y Chassaing, 2004).

Las circunstancias anteriores explican por qué es casi imposible conseguir un alimento fresco libre de *L. monocytogenes*. De hecho, se han asociado brotes de listeriosis a diversos alimentos. Entre ellos, quesos blandos (Bannister, 1987; Linnan y col., 1988; Azadian y col., 1989), leche pasteurizada contaminada post-proceso (Fleming y col., 1985), productos cárnicos (Goulet y col., 1993; Jacket y col., 1995), pescado crudo y marisco (Lennon y col., 1984; Riedo y col., 1994), paté (McLauchlin y col., 1991; Kittson, 1992), ensalada de

repollo (Schlech y col., 1983) y de arroz (Salamina y col., 1996) y diferentes productos listos para el consumo RTE (del inglés, *ready to eat*) (Kerr y col., 1988; Schwartz y col., 1988; Gilbert y col., 1989; Kaczmarek y Jones, 1989). No obstante, la aplicación eficaz del sistema APPCC desde la granja al consumidor minimiza el riesgo de enfermedad alimentaria (ICMSF, 1996b, 2002).

1.10. 2 Listeriosis

En el número 1 de la revista del comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA), actualmente AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición), se recoge un artículo titulado “Aplicación de altas presiones a la carne” (AESA, 2005a). En él figura un conciso resumen sobre aspectos generales de la listeriosis y del peligro que supone la presencia de *L. monocytogenes* en la carne y productos cárnicos. A continuación se transcriben los párrafos de mayor interés:

“Listeria monocytogenes es el agente causal de una enfermedad que se adquiere por su ingestión con los alimentos aunque también puede transmitirse de la madre al feto. La enfermedad puede ser leve o severa y... se manifiesta, en su versión leve, con fiebre, dolores musculares y a veces náuseas. La modalidad severa (invasiva) se caracteriza por fiebre repentina, dolor de cabeza intenso, rigidez del cuello y mareos, pudiendo invadir el sistema nervioso con la aparición de pérdidas del equilibrio y convulsiones, meningitis y encefalitis y, finalmente, septicemia”.

Debido a la naturaleza ubicua de *L. monocytogenes*, la exposición del hombre a ella es altamente frecuente y cualquier persona es susceptible de contraer la enfermedad. Sin embargo, *“...es muy poco común en niños, jóvenes y adultos con el sistema inmunitario sano pero hay un sector de la población, que se ha calculado en alrededor del 15% (Buchanan y col., 1997), especialmente sensible. Entre estos individuos pueden citarse a embarazadas (pueden abortar o presentar un parto prematuro), recién nacidos (pueden presentar retraso mental e hidrocefalia), inmunocomprometidos (afectados de cáncer, SIDA, trasplantes, diabetes u otras enfermedades)...”*

“... L. monocytogenes está ampliamente distribuida en todos los ambientes (alimentos, vegetación en descomposición, ensilados, agua, suelos, residuos fecales, heces de humanos y animales sanos, etc.) y se ha estimado que entre el 2 y el 6% de los humanos son portadores mudos aunque el papel que éstos desempeñan en la diseminación de la

enfermedad no se sabe aún (Rocourt, 1999)... Cuando hay una reducción de la microbiota competitiva se crea... un excepcional ambiente para el crecimiento de L. monocytogenes... esta situación es más favorable aún si la a_w se sitúa en los niveles de 0,90-0,94 a la que muchos de los microorganismos alterantes de carácter psicrotrofo no pueden multiplicarse o lo hacen lentamente. Por otra parte, L. monocytogenes se adhiere fuertemente a la superficie de las carnes y es difícil eliminarla o inactivarla. L. monocytogenes se multiplica fácilmente en los productos cárnicos refrigerados, incluso los envasados a vacío, a pH próximos a 6,0 pero su crecimiento es muy lento a pH de 5,0 (Glass y Doyle, 1989; Farber y Peterkin, 1999). Las listerias son muy difíciles de eliminar, e incluso de reducir su incidencia, en los establecimientos que elaboran este tipo de productos, debido a que las bacterias se alojan en zonas muy recónditas de los equipos, como juntas, válvulas, etc. donde pueden persistir durante años y en cualquier momento pueden contaminar el alimento, incluso si el producto ha estado libre de listerias durante meses (ICMSF, 2002)”.

“No se sabe cuál es la dosis infectiva. Sin embargo, los datos publicados (véase apéndice II”, (en este apéndice figuran muchos parámetros relativos a aspectos fisiológicos de esta bacteria y de su resistencia frente a condiciones disgenésicas así como sobre su incidencia en diversos alimentos) indican que se sitúa entre 10^2 y 10^6 u.f.c. g^{-1} (ICMSF, 2002)...”

L. monocytogenes produce una toxina citolítica y hemolítica, llamada listeriolisina O, que actúa como un importante factor de virulencia. Se trata de una proteína de 52 kD que se secreta a pH bajo y baja concentración de hierro, condiciones presentes en el interior del fagolisosoma. Cuando es fagocitado, el microorganismo empieza a fabricar la listeriolisina, que se fija al colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma. Este puede ser el principal factor implicado en la supervivencia intracelular, una de las características patogénicas más definitorias de L. monocytogenes.

En la UE, el número de casos confirmados de listeriosis en el hombre en el año 2013 fue de 1.763, lo que supone un aumento del 8,6 % respecto al año anterior (EFSA, 2015). La tasa general de notificación de la UE fue de 0,44 casos por 100.000 habitantes, con Finlandia en primer lugar (1,12), seguido de España (1,00), Suecia (0,97) y Dinamarca (0,91). Por otra parte, de todas las enfermedades zoonóticas bajo vigilancia en la UE, en el año 2013, al igual que en los anteriores, la listeriosis fue la más severa, con un 69,7% de

hospitalizaciones y una tasa de mortalidad del 15,6% de todos los casos confirmados (191 muertes).

1.11 CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA CARNE

1.11.1 Antecedentes

La carne es un producto altamente perecedero, por lo que el desarrollo de métodos de conservación de alimentos ha sido una constante del hombre a través de los tiempos. Mucho antes de la aparición de las tecnologías modernas y de que se conocieran el transporte y la refrigeración, el hombre utilizó su ingenio para extender el periodo de almacenamiento de la carne y, en general, de otros alimentos perecederos. El primer método que el hombre utilizó derivó del dominio del fuego que, aparte de otros usos, lo aplicó a la carne de los animales que capturaba y, además de ablandarla y ampliar la vida útil, estaba practicando indirectamente el ahumado. Después desarrolló, probablemente, el salazonado (que conllevaba la nitrificación procedente de las impurezas de la sal) y deshidratación al sol. Más tarde, fueron surgiendo otros métodos (fermentaciones, inmersión en aceite, acidificación con vinagre, uso de la actividad antimicrobiana de especias, etc.) que se emplearon o mejoraron durante siglos hasta llegar a Appert quien, en los primeros años del siglo XIX, introdujo los tratamientos térmicos en alimentos envasados. Años después (mediados del siglo), Pasteur explicó la naturaleza de las fermentaciones y la sensibilidad de los microorganismos frente a tratamientos térmicos y, a principios del siglo XX, se estableció la cinética de muerte de los microorganismos por este tratamiento (Bigelow y Esty, 1920), lo que supuso un gran avance para el desarrollo tecnológico de la conservación de alimentos por el calor. Ya avanzado el siglo XX, se perfeccionaron diversos métodos de conservación [por ejemplo, deshidratación y tratamientos en autoclave y UHT (del inglés, *Ultra High Temperature*), entre otros] y se desarrollaron otros nuevos, como la congelación, liofilización, aplicación de radiaciones ionizantes, etc. y los más recientes, las altas presiones, pulsos de luz, etc.

1.11.2 Refrigeración y envasado de la carne fresca

Aunque la congelación es un excelente medio de conservación, deteriora significativamente algunos atributos de la calidad del producto, de forma particular la textura y la CRA. Por otra parte, la imagen social de los alimentos refrigerados es mejor

que la de los congelados, por lo que los consumidores demandan los primeros a pesar de que los segundos se comercializan a un precio inferior.

La baja temperatura durante el sacrificio junto con la rápida refrigeración de las canales, son los principales factores que en un principio ralentizan el crecimiento microbiano y prolongan la vida útil del producto. La refrigeración de las canales hay que hacerla pronto haciendo descender su temperatura rápidamente hasta valores inferiores a 10 °C para, posteriormente, mantenerlas unos pocos grados por encima de 0 °C. De esta forma, se logra detener casi por completo el crecimiento de la microbiota mesófila, aunque a los microorganismos psicrotrofos se les presenta una gran oportunidad para su proliferación. A fin de cuentas, la refrigeración se traduce en un aumento de la vida útil. Además de las ventajas a nivel microbiológico, la refrigeración de la sala de procesado influye en la calidad del producto, manteniendo las características sensoriales de la carne, a diferencia de lo que ocurre con otros métodos de conservación. Mientras la temperatura sea más próxima a 0 °C se obtendrán mayores ventajas. Baste decir que un incremento de 1 °C reduce la vida útil de la carne entre un 10 y un 50%. Todo esto ha llevado a desarrollar métodos que permitan un enfriamiento más rápido de las canales, como la refrigeración rápida y ultra-rápida.

El término psicrófilo (etimológicamente amante del frío) se aplicó inicialmente (antes del último tercio del siglo XX) a los microorganismos que pueden multiplicarse a temperaturas próximas a 0 °C. Posteriormente, en 1976, la Federación Internacional de Lechería adoptó el término de psicrotrofo (etimológicamente crecimiento en entornos fríos) y lo definió como aquel microorganismo que puede crecer a 7 °C o a temperaturas inferiores, independientemente de su temperatura óptima de crecimiento. Para Olson y Mocquot (1980), los psicrófilos y los psicrotrofos tienen el mismo límite mínimo de temperatura de crecimiento, comprendido entre -5 y 5 °C, diferenciándose en sus temperaturas óptimas que se encuentran entre 25 y 30 °C para los psicrotrofos y entre 12 y 15 °C para los psicrófilos. Los más importantes en Tecnología de los Alimentos son los psicrotrofos, mientras que los psicrófilos hay que buscarlos en las aguas frías de, por ejemplo, los océanos.

Una carne fresca de buena calidad microbiológica contiene una tasa inicial de alrededor de 10^3 - 10^4 ufc/cm² en su superficie (Lücke, 1986). El almacenamiento de la

carne fresca a temperatura de refrigeración puede hacerse de las siguientes formas (McMillin y col., 1999; Gill y Gill, 2005; Brody, 2007):

- en aerobiosis, sin envasar o envasada en plásticos de alta permeabilidad al O₂,
- en atmósferas modificadas cuya composición es distinta a la del aire, y
- a vacío

El envasado minimiza el riesgo de contaminación (barrera mecánica), además de inhibir el crecimiento de la microbiota aerobia de la carne, en el caso del envasado a vacío o en atmósferas enriquecidas en CO₂ u otros gases, como nitrógeno. Dejando aparte las características del material de envasado, las propiedades de la carne que determinan su vida útil son, fundamentalmente, la CRA, el color, la carga microbiana inicial, la estabilidad de la grasa y la palatabilidad (Taylor, 1985; Renerre y Labadie, 1993; Zhao y col., 1994).

En la actualidad, existen muchos sistemas de envasado diferentes, desde un simple film de cobertura (utilizado para periodos cortos de conservación) hasta sistemas de envasado a vacío o en atmósferas modificadas (para un almacenamiento más prolongado). Además, la posible combinación de diferentes tipos de envasado a lo largo de la cadena de producción, potencia la efectividad de cada uno de ellos.

1.11.2.1 Alteración de la carne refrigerada mantenida en aerobiosis o envasada con plásticos de elevada permeabilidad al oxígeno

Gill y Harrison (1989) hicieron un estudio sobre la microbiota inicial presente en la carne de cerdo; informaron que se podían aceptar unos valores medios de un 39% de lactobacilos, 28% de enterobacterias, 24% de pseudomonas, 7% de *B. thermosphacta* y 2% de enterococos. Naturalmente, estos valores pueden variar ampliamente de los que pueden obtener unos y otros investigadores dado el elevado número de factores/agentes que influyen en la contaminación. No obstante, los datos anteriores pueden utilizarse de referencia.

La carne se mantiene en atmósferas con una humedad relativamente alta para reducir al máximo las pérdidas de peso por evaporación. En estas condiciones y cuando las temperaturas se aproximan a 0 °C, hay microorganismos anaerobios facultativos psicrotrofos [p. ej., bacterias lácticas (BAL), *Brochothrix thermosphacta* y

enterobacterias], que crecen más lentamente que las bacterias psicrotrofas aerobias del grupo *Pseudomonas/Acinetobacter/Moraxella* y, por ello, son éstas normalmente las más abundantes en las carnes refrigeradas (Davidson y col., 1973), siendo, por tanto, las responsables de la alteración pero, por otra parte, entre estas últimas, las pseudomonas son las que presentan el menor tiempo de generación a temperaturas de refrigeración (Gill y Newton, 1977), lo que explica su predominio en la microbiota responsable de la alteración superficial de la carne refrigerada mantenida en aerobiosis. A esta conclusión han llegado distintos autores (Gardner y col., 1967; Patterson, 1970; Jay, 1972; McMeekin y col., 1978, Rosset, 1982; Asensio y col., 1988). Por ejemplo, Gardner y col. (1967) comprobaron que la carne de cerdo, almacenada a 2 °C, estaba compuesta en un 96% por *Pseudomonas/Acinetobacter/Moraxella* cuando se manifestó la alteración y Patterson (1970) observó el mismo grupo dominante estudiando la alteración de la carne de cordero. Estos estudios sugieren también que son pocas las diferencias en el tipo de microbiota alterante de las carnes de vacuno, cerdo y ovino almacenadas en aerobiosis a temperatura de refrigeración.

La alteración se manifiesta por cambios en el olor, color y aparición de limosidades. El primer signo es el olor anómalo, normalmente desagradable, que emana de la carne, admitiéndose de forma general que ocurre cuando los recuentos de bacterias aerobias alcanzan el valor de 5×10^7 ufc/cm² (Ayres, 1960b; Dainty y col., 1983). Posteriormente, cuando la tasa es de alrededor de 10^8 ufc/cm², la carne pierde el brillo que le caracteriza debido a la aparición de limosidad superficial (Ayres, 1960a; Siegel, 2001) que no es más que polisacáridos (normalmente dextranos o levanos) sintetizados por la microbiota dominante.

Los aerobios psicrotrofos Gram negativos son muy sensibles a la disminución de la a_w y si desciende de los valores normales (0,98-0,99), por evaporación de la humedad del ambiente en que se encuentra la carne, a 0,96 o menos, se inhibe el crecimiento de la mayoría de los microorganismos de este tipo, reemplazándose por algunos Gram positivos como lactobacilos, micrococos y pediococos (Leistner y Rödel, 1976b; Rödel y Krispien, 1977), levaduras, como *Candida*, *Monilia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* y *Saccharomyces* (Rödel y Krispien, 1977) y mohos, entre los que se incluyen *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Mucor* (Rödel y Krispien, 1977).

Cuando la carne se envasa en bolsas de plástico de elevada permeabilidad al oxígeno, las condiciones en el interior son muy similares a cuando se envasa en aerobiosis y la humedad del interior es elevada si el material polimérico es de baja permeabilidad al vapor de agua. El dióxido de carbono que normalmente se desprende podría difundir al exterior porque los polímeros que comúnmente se utilizan son permeables a este gas. No obstante, a pesar de la gran permeabilidad de los materiales empleados para este tipo de envasado, es inevitable cierta restricción en el intercambio gaseoso a través de los mismos, lo que puede dar lugar a un ligero acúmulo de CO₂ en el interior de la bolsa (Gardner y col., 1967) y, debido al efecto inhibidor que el CO₂ tiene sobre *Pseudomonas* spp., se observa un número ligeramente mayor de *B. thermosphacta* en las carnes envasadas en bolsas de elevada permeabilidad que en aerobiosis (Dainty y col., 1983).

1.11.2.2 Alteración de la carne refrigerada envasada a vacío

El primer método de envasado en atmósfera protectora que se utilizó comercialmente fue el envasado a vacío. Se trata de un sistema sencillo que únicamente conlleva la evacuación del aire contenido en el envase. El vacío no resulta especialmente interesante para la venta directa de carne fresca, ya que su color, al ser un entorno anóxico, es el rojo púrpura (de la Mb reducida) no bien aceptado por el consumidor, pero sí se utiliza en el suministro entre intermediarios (mayoristas, comercio entre países, etc.) y con grandes beneficios sobre la comercialización del producto, como pueden ser el bajo coste, el ahorro de espacio, la facilidad de manejo y la posibilidad de almacenamiento en refrigeración durante tiempos relativamente largos en comparación con el mismo producto envasado en aerobiosis o en atmósfera enriquecida en CO₂. Otras ventajas de este tipo de envasado son el ablandamiento de la carne (ya que la maduración no se interrumpe), una mayor estabilidad del color (la Mb es muy estable en ausencia de oxígeno y el color rojo brillante se recupera una vez abierto el envase al oxigenarse el pigmento y convertirse en OxiMb) y la disminución de posibles alteraciones microbianas por sustitución de la microbiota aerobia alterante por otra de crecimiento más lento, particularmente BAL.

El envasado a vacío conlleva el empleo de bolsas de plástico de baja permeabilidad a los gases (velocidad de transmisión de oxígeno de 5 a 90 mL/m²/24h/atm y de CO₂ de 20 a 300 mL/m²/24h/atm) (Dainty y col., 1983) para evitar el acceso de oxígeno al interior. El O₂ remanente que queda en la bolsa se va convirtiendo en CO₂ tanto por el metabolismo residual de la carne como por la actividad respiratoria de las bacterias (Gardner y col.,

1967; Johnson, 1974). Como consecuencia, y debido a que la impermeabilidad del plástico reduce el intercambio de gases con el exterior, la atmósfera se enriquece en CO₂ alcanzando valores de hasta el 15-30% (Lawrie, 1977) al tiempo que el O₂ disminuye a menos del 1% (Seideman y Durland, 1983).

Las principales diferencias entre el crecimiento microbiano en carne almacenada en aerobiosis o envasada a vacío se conocen desde hace muchos años (Jaye y col., 1962). En el envase a vacío se ve muy restringido, prácticamente detenido, el crecimiento de bacterias aerobias Gram negativas, en especial las *Pseudomonas* (Ingram, 1962; Ordal, 1962; Pierson y col., 1970; Johnson, 1974; Asensio y col., 1988) que se reemplazan por Gram positivas, sobre todo BAL (Roth y Clark, 1972; Beebe y col., 1976; Seideman y col., 1976; Dainty y col., 1979). El recuento total (debido fundamentalmente a las BAL) en la carne a vacío cuando se estabiliza es inferior a la que se logra en el envasado en aerobiosis (debido principalmente a bacterias Gram negativas), es decir, inferior a 5×10^7 - 10^8 ufc/cm², y así puede permanecer durante 7-10 semanas y rara vez, si alguna, se ha observado una tasa superior a 10^8 ufc/cm² (Dainty y col., 1979; Ordóñez y col., 1996).

En los recuentos iniciales, las BAL representan una pequeña proporción, pero después de 6-12 días de almacenamiento a vacío suponen el 50% de la población (Ordal, 1962). Otros autores han encontrado niveles superiores, de entre el 85 y 99% (Pierson y col., 1970; Seideman y col., 1976). Entre las BAL que participan en la alteración destacan especies pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Por otra parte, algunas cepas de BAL producen bacteriocinas que pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias alterantes de la carne en anaerobiosis (Roth y Clark, 1972).

Junto a las BAL se han encontrado otros microorganismos en la carne envasada a vacío aunque no de forma consistente. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de *B. thermosphacta* a niveles de incluso 10^6 /cm² (Sutherland y col., 1975; Dainty y col., 1979; Erichsen y Molin, 1981; Asensio y col., 1988). Por el contrario, en otras ocasiones ni siquiera se ha detectado esta bacteria (Pierson y col., 1970; Roth y Clark, 1972). Algo parecido ocurre con las enterobacterias, no aparecen en todos los estudios publicados, pero pueden constituir el 10% de la microbiota total con tasas de 10^6 /cm² (Dainty y col., 1979) después de 4 ó más semanas de almacenamiento (Beebe y col., 1976; Seideman y col., 1976; Ordóñez y col., 1991).

Las diferencias que se observan entre la composición de la microbiota de la carne almacenada a vacío o en aerobiosis también se reflejan en los signos de la alteración. En lugar de la putrefacción o aparición de limo característico de la carne envasada en aerobiosis, en la carne a vacío el metabolismo de las BAL genera los ácidos láctico, isobutanoico, isopentanoico y acético, que proporcionan al producto un olor ácido/agrio/lácteo denominado por algunos autores olor a “envasado a vacío” (De Pablo y col., 1989; Ordóñez y col., 1991).

En cuanto al color que presenta la carne envasada a vacío, hay que considerar que, después de la formación inicial de MetMb, ésta se reduce a Mb (Pierson y col., 1970), la cual persiste a lo largo del almacenamiento (Johnson, 1974; Asensio y col., 1988; Ordóñez y col., 1996). Los niveles de MetMb que se alcanzan en la carne envasada a vacío son realmente bajos, no llegan al 15% después de 25 días (Asensio y col., 1988) y, además, dicha concentración se alcanza en los primeros días, quizás debido al oxígeno residual (no se olvide que la oxidación de la Mb es máxima a la tensión de oxígeno de 7,5 mm de Hg), pero este gas rápidamente se agota por las actividades metabólicas del músculo y microorganismos y, por otra parte, la barrera polimérica impide el ingreso de cantidades apreciables de oxígeno del exterior, reduciéndose la concentración de este gas a 0,1% o menos (Taylor, 1972), con lo que la oxidación de la Mb prácticamente se detiene (Ledward, 1970). Al no existir oxígeno, evidentemente, la Mb no se convierte en MetMb pero, por la misma razón, tampoco se forma OxiMb. Por ello, la carne presenta el color rojo púrpura típico de la Mb reducida, no tan atractivo como el rojo brillante de la OxiMb que presentan las carnes envasadas en atmósferas ricas en oxígeno.

1.11.2.3 Alteración de la carne refrigerada envasada en atmósferas modificadas (MAP)

El envasado en atmósfera modificada (del inglés, *modified atmosphere packaging*, MAP) permite también el aumento de la vida útil de la carne fresca y suele ser el método de elección cuando el consumidor es el objeto final de la distribución. Ya en 1930 se transportaron canales de carne en atmósferas enriquecidas en CO₂ para ampliar su vida útil (Genigeorgis, 1985). Entonces se trataban de atmósferas controladas en las que las concentraciones relativas de los gases seleccionados se mantenían constantes durante todo el almacenamiento mediante la renovación continua de los mismos. Sin embargo, fue a partir de 1970, con el desarrollo de nuevos materiales, de forma especial el advenimiento

del material plástico, y tecnologías, cuando se hizo uso de la venta al detalle de alimentos MAP (Brody, 1996).

El MAP implica la retirada de aire del envase para su sustitución por un gas o una mezcla de gases, cuya composición varía según el producto envasado. En carnes rojas la elección de la atmósfera se realiza con un doble objetivo: inhibición del crecimiento de la microbiota aerobia y mantenimiento del color rojo brillante de la OxiMb. Los primeros estudios que se realizaron sobre carne fresca MAP de una forma sistemática fueron en Canadá (Clark y Lentz, 1969) y más tarde, en la década siguiente, en el Reino Unido (McDougall y Taylor, 1975; Ordóñez y Ledward, 1977). A partir de entonces son numerosos los artículos que se han publicado acerca del envasado, tanto de la carne como de diversos productos cárnicos, en atmósferas modificadas.

Son muchos los gases con actividad bactericida o bacteriostática. Entre ellos, óxido de etileno, óxido de propileno, dióxido de carbono, ozono, monóxido de carbono, dióxido de azufre, etc. De éstos, unos, como el CO, presentan serios inconvenientes para su aplicación comercial debido a su toxicidad; otros, como el óxido de etileno, se han utilizado años atrás (p. ej. para la fumigación de ciertos productos secos, hierbas aromáticas, especias, setas deshidratadas, frutos secos, etc.), pero se prohibió su uso (directiva 86/355/EEC) debido, por una parte, a sus propiedades inflamables y explosivas y, por otra, porque quedan residuos tóxicos (p. ej. etilenglicol y clorhidrinas). Finalmente, algunos, como el SO₂, en forma de sulfitos, se utilizan ampliamente en ciertos productos (p. ej. zumos de frutas, mariscos) pero no deberían usarse para tratar alimentos ricos en tiamina porque la degradan (Archer y Tannenbaum, 1979) y en el caso particular de la carne, su uso está regulado por las legislaciones alimentarias que varían dependiendo del país que se trate. Este gas estabiliza el color de la carne al reaccionar con la Mb, por lo que puede producir una falsa impresión en el consumidor acerca del buen estado del producto (Lück, 1981). Por tanto, los gases que pueden utilizarse sin reservas para ampliar la vida útil de la carne quedan restringidos a unos pocos.

El que se ha mostrado más eficaz, tanto en alimentos de origen vegetal como animal, es el dióxido de carbono porque inhibe eficazmente el crecimiento de la microbiota aerobia y retarda los fenómenos fisiológicos postcosecha de frutas y hortalizas. Este gas va unido frecuentemente al nitrógeno que, por ser inerte, se utiliza como gas de relleno. El enriquecimiento de la atmósfera en oxígeno sólo se usa en carnes frescas para resaltar el

color rojo brillante de la misma con el objetivo de mantener la Mb en estado oxigenado. Cuando se utiliza solo nitrógeno (100%), el comportamiento de la microbiota puede considerarse similar al que se observa en vacío, prevaleciendo fundamentalmente los lactobacilos (Thippareddi y Phebus, 2007).

Como el enriquecimiento de la atmósfera en CO₂ es la estrategia que más se utiliza para ampliar la vida útil de la carne fresca, es la que se va a describir con mayor detenimiento. Desde un punto de vista microbiológico, es muy común fijar como límite de vida útil de la carne fresca refrigerada un recuento total de bacterias de 5×10^7 ufc/cm². A la temperatura habitual de almacenamiento de la carne (3-4 °C), la evolución de la microbiota que se observa en carne refrigerada almacenada en aerobiosis se ajusta a lo que han descrito muchos autores (p. ej. Ayres, 1960b; Nottingham, 1982; Dainty y col., 1983; Asensio y col., 1988; Siegel, 2001) y la vida útil no es superior a 5-7 días a una temperatura de 3-5 °C, mostrando los signos de alteración que se han descrito en el apartado 1.11.2.1. El recuento total de microorganismos viables en la carne envasada en atmósferas enriquecidas en CO₂/aire (20/80) (v/v) aumenta también continuamente desde el inicio del periodo de conservación, si bien dicho incremento es más lento que el que se produce en la carne en atmósfera de aire (Asensio y col., 1988). En consecuencia, el tiempo necesario para que se alcancen tasas de alrededor de 5×10^7 ufc/cm² en la superficie de la carne es mayor, habiéndose ofrecido un tiempo de aproximadamente el doble al necesario para que se alcancen las mismas tasas en atmósferas de aire. Por ejemplo, a 1 °C es de alrededor de 20 días en atmósferas enriquecidas con un 20% de CO₂ frente a los 9-11 días en aerobiosis (Asensio y col., 1988). Los microorganismos más abundantes al final del almacenamiento en la atmósfera enriquecida en CO₂ son *B. thermosphacta* y *Lactobacillus* spp., aunque también suelen detectarse enterobacterias (Newton y col., 1977; Asensio y col., 1988; Ordóñez y col., 1991). El CO₂ ocasiona, pues, una fuerte inhibición de la microbiota aerobia Gram negativa dejando de ser los microorganismos responsables de la alteración. Las bacterias que sustituyen a esta microbiota son de crecimiento más lento y, en definitiva, tardan más tiempo en llegar al nivel crítico del recuento total. Además, los olores anómalos son menos ofensivos al olfato, ya que se deben a sustancias derivadas de una fermentación láctica. En conclusión, la aplicación de CO₂ a las concentraciones mencionadas ocasiona aproximadamente la duplicación de la vida útil de la carne desde un punto de vista microbiológico. En la práctica se utilizan concentraciones de CO₂ del 20-30%.

Una elevada concentración de oxígeno permite mantener el color rojo brillante, característico de la carne fresca durante más tiempo que en atmósfera de aire (Georgala y Davidson, 1970; Clark y Lentz, 1973; Ordóñez y Ledward, 1977). Cuando se utilizan atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono y oxígeno, la concentración del primer gas es habitualmente del 20-30% y de un 80-70% la del segundo. En este sistema, la evolución de la microbiota de la carne es similar a la que se observa en MAP CO₂/aire (20/80) (v/v) que se ha descrito en el párrafo anterior. Tanto si se enriquece la atmosfera sólo en CO₂ (el resto aire) como si se hace en CO₂ (20-30%) y O₂ (80-70%) las gráficas derivadas del estudio de los cambios en la microbiota durante el almacenamiento prácticamente se superponen (Asensio y col., 1988; Ordóñez y col., 1991). Hay que concluir, pues, que el CO₂ es el agente que ocasiona la ampliación de la vida útil de la carne y que la concentración de oxígeno no afecta al desarrollo de los microorganismos. Del mismo modo, la composición de la microbiota en atmósfera de CO₂/O₂ (20/80) (v/v) cuando se manifiesta la alteración corresponde mayoritariamente, al igual que en la atmósfera de CO₂/aire (20/80) (v/v), a *B. thermosphacta* y *Lactobacillus* spp. (Asensio y col., 1988; Ordóñez y col., 1991).

En el caso de las carnes rojas, el color de las mismas, como anteriormente se ha mencionado, adquiere una gran relevancia. Del análisis conjunto de la carga microbiana y la acumulación de MetMb durante el almacenamiento de la carne fresca se desprende que en atmósfera de aire el factor limitante de la vida útil de la carne es el crecimiento microbiano, mientras que en atmósferas de CO₂/aire (20/80) (v/v) es la oxidación de la Mb, ya que adquiere un color pardo neto debido a la MetMb antes de que se logre el valor crítico de los recuentos (Asensio y col., 1988), lo que permite concluir que el envasado de la carne en atmósferas enriquecidas en CO₂ (20-30%) y O₂ (80-70%) es útil para aumentar la vida útil de la carne, tanto desde un punto de vista microbiológico como sensorial (color). El retraso en la oxidación de la Mb en atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono y oxígeno no se debe a la acción conjunta de ambos gases sino sólo a la elevada concentración de oxígeno. La explicación es sencilla; se debe a un efecto puramente físico. Al existir un porcentaje alto de oxígeno en la atmósfera y al difundir éste desde la superficie al interior de la carne, habrá una mayor proporción de oxígeno a mayor profundidad y, por tanto, el espesor de la capa de OxiMb también será mayor. Como el color que muestra la carne se debe al estado en que se encuentre mayoritariamente la Mb en los primeros milímetros superficiales, la capa superficial de OxiMb enmascara la

MetMb formada a mayor profundidad y se oxidará a mayor velocidad cuando la tensión de oxígeno sea de 7,5 mm de Hg (Ledward, 1970). Por tanto, si la concentración de oxígeno en el envase es suficientemente alta, la zona de color pardo se encontrará a profundidad suficiente como para retrasar el color que se aprecia desde el exterior (Taylor y McDougall, 1973; Ledward y col., 1977; Ordóñez y Ledward, 1977). En este sentido, se ha calculado que, en *longissimus dorsi* de vacuno, una capa superficial de OxiMb de unos 5 mm de espesor es suficiente para mantener un "razonable" color rojo brillante durante una semana a 1 °C. Estas condiciones son las que se dan en la carne expuesta al aire (McDougall y Taylor, 1975). Por tanto, en atmósferas enriquecidas con un 80% de oxígeno la tensión de oxígeno del 7,5% estará a mayor profundidad y, por ende, es más duradera la retención del color rojo brillante.

La sensibilidad de los microorganismos frente al CO₂ es muy variable, dependiendo del género, especie y cepa. Por ejemplo, el crecimiento de algunas cepas de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Micrococcus* se detiene totalmente con un 100% de CO₂ (Coyne, 1932), mientras que en otros, como *Proteus* spp. (Haines, 1933), *C. perfringens* (Parekh y Solberg, 1970) y algunos *Lactobacillus* (Ogilvy y Ayres, 1953), el efecto es escaso o nulo. Cuando los microorganismos son sensibles al CO₂, su efecto inhibitor aumenta de forma lineal al incrementarse la concentración de dicho gas (Ogilvy y Ayres, 1951). El efecto del CO₂ se pone de manifiesto mediante un aumento de la fase de latencia y del tiempo de generación (Tomkins, 1932; Haines, 1933). Como consecuencia, si el CO₂ se aplica cuando las células bacterianas están en fase logarítmica, su efecto disminuye considerablemente (Clark y Lentz, 1969).

Las referencias anteriores muestran que desde hace mucho tiempo se conoce el efecto inhibitor del CO₂ en el crecimiento de diversos microorganismos aerobios, y de ciertos anaerobios. Sin embargo, aún no se conoce totalmente el mecanismo que opera, habiéndose emitido diversas hipótesis (Daniels y col., 1985; Dixon y Kell, 1989). En un principio se pensó que la inhibición se debía a un desplazamiento del oxígeno, pero al demostrarse que el CO₂ inhibía también a ciertos anaerobios se descartó esta posibilidad. Más tarde la inhibición se atribuyó a una disminución del pH (una concentración del 20% de CO₂ puede ocasionar una bajada del pH muy importante, tanto como una unidad), pero experimentos con medios tamponados (King y Nagel, 1967) y en alimentos naturalmente tamponados (como la carne) demostraron que la bajada del pH apenas era apreciable y, por

tanto, el pH del medio no podía explicar totalmente los efectos adversos del CO₂ (Clark y Takács, 1983). Otra explicación que se ha ofrecido es la interferencia del gas con ciertas enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo (Kritzman y col., 1977; Gill y Tan, 1980), como inhibición del metabolismo del succinato (King y Nagel, 1967). También se ha dicho que el ion bicarbonato provocaría cambios en la permeabilidad de la membrana que afectarían al paso de sustancias solubles al interior (Aickin y Thomas, 1975; Turin y Warner, 1977). Una hipótesis más atribuye la inhibición a un efecto de acción de masas que interferiría en los procesos descarboxilativos. Es posible que estén implicados más de un mecanismo de los anteriormente mencionados e incluso otros aún desconocidos.

Aunque las atmósferas modificadas utilizadas comúnmente en la industria cárnica para la venta de piezas de carnes rojas al detalle son las enriquecidas en CO₂ y O₂, se ha investigado el uso de otros gases, como los gases nobles, óxido nitroso, etc., pero su utilización comercial está muy limitada. En el caso de los gases nobles, sólo el argón y helio están permitidos por la legislación española (RD 142/2002, de 1 de febrero) y se pueden utilizar como sustitutos del nitrógeno, aunque su precio es significativamente mayor.

En conclusión, las combinaciones más comunes que se aplican en carnes rojas para venta directa al consumidor son 20-30% CO₂; 80-70% O₂ ó 20% CO₂; 70% O₂; 10% N₂ o Ar. Sin embargo, cuando se considera el canal de distribución entre mayoristas, se puede prescindir del requisito del color ya que el consumidor no va a percibirlo y, en este caso, quizás la mejor opción es el envasado a vacío.

1.12 IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS

1.12.1 Antecedentes

Radiación es la energía que se propaga en forma de ondas electromagnéticas (rayos UV, rayos gamma, rayos X, etc.) o partículas subatómicas (partículas alfa, beta, neutrones, etc.) a través del espacio. La radiación ionizante es la que tiene energía suficiente para provocar ionización. El ser humano ha estado expuesto a radiaciones ionizantes desde el comienzo de los tiempos. No obstante, hace menos de un siglo que la humanidad descubrió este fenómeno elemental y universal. Las fuentes naturales de radiación se encuentran tanto en el Universo como en la Tierra. En el año 1896, Antoine Henri Becquerel (premio Nobel de Física en 1903) informó del descubrimiento de la radioactividad al observar que, al revelar

placas fotográficas guardadas junto a uranio, se habían velado. Dos años más tarde, en 1898, Marie (galardonada con dos premios Nobel, en Física y Química) y Pierre Curie, descubrieron que, a medida que el uranio cedía radiación, se transformaba misteriosamente en otros elementos. Llamaron a uno de ellos polonio, en referencia a su país natal, y radio (el elemento “brillante”) a otro. P. Curie murió atropellado por un vehículo en 1906 y M. Curie en 1934, afectada de anemia aplásica, probablemente debida a las radiaciones a las que estuvo expuesta en sus trabajos, y cuyos nocivos efectos eran aún desconocidos. Por otra parte, el descubrimiento de rayos X (que tanta importancia tuvo después en la exploración de la materia cristalina, en la detección de defectos en materiales metálicos y, sobre todo, en diagnóstico médico) corrió a cargo del físico alemán Wilhelm C. Roentgen en el año 1895.

1.12.2 Irradiación de alimentos

Aunque frecuentemente la irradiación de alimentos se considera como una tecnología nueva, las primeras ideas de tratar los alimentos con radiaciones ionizantes fue publicada en 1896 (Minck, 1986) y más tarde se estudió el efecto de la radiación en los microorganismos. A principios del siglo XX, se inscribieron patentes en Estados Unidos (Lieber, 1905) y en el Reino Unido (Appleby y Barks, 1905) para el uso de radiaciones ionizantes con el objetivo de destruir bacterias en alimentos. Sin embargo, el término de “irradiación” no aparece en la bibliografía hasta 1940. En sus inicios (1890-1940), la historia de la irradiación de alimentos está fuertemente ligada a la física de la radiación y al desarrollo de sistemas y fuentes posibles para este fin. En 1921, se emplearon los rayos X para eliminar *Trichinella spiralis* de carne de cerdo cruda (Schwartz, 1921) y se llevaron a cabo estudios para destruir el escarabajo del tabaco mediante este tratamiento. Entre 1923 y 1927 surgieron las primeras publicaciones sobre los efectos de la radiación ionizante en enzimas. En el año 1930, se expidió una patente francesa al alemán Otto Wüst para la utilización de la radiación ionizante en la conservación de los alimentos. Entre 1942 y 1943, un equipo del Instituto Tecnológico de Massachussets, bajo un contrato con el ejército de EEUU, demostró la posibilidad de conservar carne de vaca picada mediante la aplicación de rayos X. Con posterioridad a la segunda guerra mundial, comenzó en EEUU el desarrollo de la irradiación de alimentos por el gobierno, la industria, las universidades y las instituciones privadas (Thayer y col 1986), y en 1950 se inició el programa de irradiación de alimentos por la Comisión de Energía Atómica de EEUU. Paralelamente, en

el Reino Unido también comenzó un programa similar que fue seguido por numerosos países. Un año más tarde, este tratamiento se usó para tratar diferentes alimentos (Proctor y Goldblith, 1951).

De acuerdo a Thayer y col. (1986), las primeras investigaciones sobre la irradiación de alimentos concluyeron que únicamente los electrones podían aplicarse de un modo eficiente y seguro. Los rayos X resultaron poco prácticos debido a la muy baja eficiencia en su generación a partir de electrones. La luz ultravioleta y las partículas alfa presentaron una limitada capacidad de penetración en la materia. Los neutrones, sin embargo, tenían un gran poder de penetración pero podían inducir radiactividad en los alimentos, por lo que su uso, en aquel entonces, también se consideró inadecuado.

Después de 1953, la Armada de EEUU realizó una amplia investigación sobre la radiación de carne, pollo y otros alimentos. Los primeros estudios estuvieron dirigidos hacia la esterilización de productos cárnicos y avícolas y no para aumentar la vida útil o la pasteurización (higienización) de los mismos (Sigurbjornsson y Loaharanu, 1987). Los ensayos a gran escala también se dirigieron a la seguridad y salubridad de estos productos irradiados a dosis superiores a 10 kGy (Ronning y col., 1980; Thayer y col., 1987). Además de los estudios realizados en EEUU, entre los años 1950 y 1960, se emprendieron trabajos en este campo en otros países como Bélgica, Canadá, Francia, Alemania, Holanda, la Unión Soviética y el Reino Unido, y a partir de la década de 1950 se realizaron estudios en prácticamente todo el mundo sobre las posibilidades de aplicar radiaciones ionizantes a los alimentos, sus ventajas e inconvenientes, su comparación con los tratamientos térmicos, sus efectos sobre los nutrientes y sobre la calidad sensorial así como acerca de la búsqueda de indicadores de la radiación. Igualmente, se estudió la posibilidad de que la radiación generase sustancias de carácter tóxico. Desde esa década los hitos más importantes pueden resumirse como sigue:

- En 1963, la FDA concedió a la Armada de EEUU autorización para esterilizar panceta cruda envasada a vacío mediante aplicación, a 5 °C, de radiaciones ionizantes a dosis entre 45 y 56 kGy (Thayer y col., 1987), aunque se rescindió 5 años después.
- En 1981, un comité de expertos de la FAO/IAEA/WHO declaró que *“la irradiación de cualquier artículo alimentario hasta una dosis global media de 10*

kGy no provoca peligros tóxicos; por lo tanto, el ensayo toxicológico del alimento no será requerido”.

- La FDA, en 1985, aprobó la irradiación de la carne de cerdo para la eliminación de *Trichinella spiralis*; en 1986, para retrasar la maduración, inhibir el crecimiento de microorganismos y descontaminar hortalizas y especias; y en 1990, para el control de *Salmonella* spp. en la carne de aves de corral.
- En 1999, la UE establece dos líneas de actuación. Una (Directiva 1999/2/CE) relativa a la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios y de ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. En el Anexo I se establecen las condiciones para la autorización de la irradiación de productos alimenticios orientada a la seguridad alimentaria y en el Anexo II, las fuentes de radiaciones ionizantes permitidas. La segunda (Directiva 1999/3/CE), regula los productos alimenticios que pueden tratarse y las dosis máximas permitidas. Se permite la irradiación de “hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales” a dosis iguales o inferiores a 10 kGy. No obstante, se permite a los países miembros ampliar la lista. En el informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), actualmente AECOSAN, sobre la aplicación de las radiaciones ionizantes para la higienización de la carne, los preparados cárnicos y los productos cárnicos (AESAN, 2013) se recoge una lista de productos de origen animal cuyo tratamiento por radiaciones ionizantes está autorizado en diversos estados miembros.
- El RD 348/2001, de 4 de abril de 2001, regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones que, en esencia, incorpora las directivas de la UE.
- El Code of Federal Regulation Title 21 (21 CFR 179.26) de la FDA recoge cronológicamente los productos alimentarios que se han autorizado y las dosis permitidas. En la lista, el N°13 (enmienda del 30/11/2012 de regulaciones anteriores) autoriza la aplicación (textualmente) “*For control of foodborne pathogens, and extension of shelf-life, in unrefrigerated (as well as refrigerated) uncooked meat, meat byproducts, and certain meat food products*” “*Not to exceed 4.5 kGy*”, y en el N°14, la irradiación de crustáceos crudos, cocidos o

parcialmente cocidos hasta 6 kGy, dosis que hasta entonces sólo se admitía para productos congelados.

- La EFSA (2011a) emitió una opinión científica acerca de la eficacia de la irradiación de alimentos y la seguridad microbiológica de los alimentos tratados. En él se describen diversos efectos concernientes a supervivencia, mutaciones, producción de toxinas, desarrollo de resistencia a las radiaciones, etc. Entre las conclusiones cabe destacar (textualmente): “...*the Opinion confirms that there are no microbiological risks for the consumer linked to the use of food irradiation and its consequences on the food microflora....*”... “*Irradiation should be considered as one of several approaches to reducing pathogens in food and thus helping to ensure protection of consumers’ health. It is also recommended that food irradiation should only be used in conjunction with an integrated food safety management program and the Opinion concludes that when this includes GAP, GHP, GMP and HACCP, and depending on the dose applied, food irradiation can contribute to improved consumer safety by reducing food-borne pathogens*”.
- En España, la AESA elaboró en 2005 un informe sobre la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos; en él se recogen diversos aspectos relacionados con la higienización y ampliación de la vida útil de productos alimentarios, incluidos los cárnicos. Entre otras cosas se concluye: “*La aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos a dosis de 10 kGy consigue alcanzar perfectamente el objetivo de seguridad alimentaria en relación con las bacterias patógenas no esporuladas*”... “*con dosis menores a los 10 kGy se logra perfectamente el objetivo de una protección adecuada del consumidor (ALOP). Dada la posibilidad de que las radiaciones ionizantes provoquen sobre todo en los alimentos de origen animal efectos sensoriales y nutricionales desfavorables, se podría reducir a dosis hasta alrededor de 6 y 4 kGy, respectivamente, consiguiéndose igualmente el FSO.*” (AESA, 2005b). Recientemente, la ACOSAN volvió a emitir un segundo informe sobre el tema (AESAN, 2013), en este caso específico de carne y productos cárnicos. La AESAN, basándose en esencia en los documentos publicados por la FDA y EFSA, entre otras cosas, indica textualmente: “*sin duda, la irradiación puede ser una herramienta efectiva para reducir o eliminar los microorganismos (alterantes y patógenos) de los alimentos*”... “*De acuerdo con los datos y estudios existentes se puede concluir que las dosis de radiación ionizante comprendidas entre 1-10 kGy son seguras*

para su uso en carne (sin cocinar, refrigerada y no refrigerada) y sus derivados (EFSA, 2011b)”. No obstante, dicho informe, a pesar de su publicación en 2013, peca de falta de actualización dado que no recoge muchos de los artículos publicados sobre la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos en general y de productos cárnicos en particular. Además, a pesar de ser la agencia española, tampoco analiza los resultados de las dos decenas de artículos de investigadores españoles que han sido publicados en revistas de prestigio durante el periodo 2007-2014. De estos, una buena cantidad son coautores los supervisores de esta tesis, incluidos los de la autora de esta memoria que figuran en la misma.

En cualquier caso, hay que indicar que la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos es una herramienta muy útil para la consecución de diversos objetivos (entre ellos, el control de la microbiota alterante y patógena) pero conviene señalar que nunca puede sustituir a la correcta fabricación y manipulación de los alimentos. Esto es un principio que debe tenerse siempre presente, independientemente de la tecnología que se utilice para el procesado.

El volumen mundial de alimentos sometidos a tratamiento con radiaciones ionizantes es superior a 400.000 toneladas anuales con un claro predominio en los países asiáticos (Kume y col., 2009). No obstante, se estima que la irradiación de alimentos irá ganando terreno a los métodos tradicionales de conservación de alimentos, porque ni los tratamientos térmicos ni otros métodos han conseguido resolver todos los problemas que la industria alimentaria actual tiene planteados y, por otra parte, en ciertos productos ni siquiera es factible su aplicación. Se podría citar al respecto los alimentos listos para su consumo.

Hay que considerar el gran rechazo social que existe todavía hacia los alimentos irradiados, debido probablemente al desconocimiento de esta nueva tecnología y a la asociación errónea con “radioactividad” por parte de los consumidores. Probablemente, el término “irradiación de alimentos” es inconveniente y muy genérico, ya que no describe el proceso real de la aplicación de la radiación ionizante. Tal vez fuese más aceptado por la sociedad si se cambiara ese término tan desafortunado por el de “ionización electrónica” o simplemente “ionización”.

1.12.3 Radiaciones ionizantes y sus fuentes

Las radiaciones electromagnéticas de menor frecuencia que la necesaria para producir ionización, como la radiación ultravioleta, visible, infrarroja, microondas y radiofrecuencias, hasta los campos de frecuencia extremadamente baja, comprenden la región del espectro conocida como radiación no ionizante. Las ionizantes son ondas electromagnéticas de muy alta frecuencia (30×10^{15} - 30×10^{18} Hz), que tienen suficiente energía para producir ionización en los átomos y/o moléculas del material con el que interactúan. Este tipo de radiación incluye a las partículas alfa (^4He), partículas beta (electrones), rayos X ($>30 \times 10^{15}$ Hz) y rayos gamma ($>30 \times 10^{18}$ Hz). Las dos últimas se diferencian en su origen; los rayos X se producen al chocar electrones contra un blanco metálico, mientras que la radiación gamma se ha asociado normalmente a las emisiones de los radionúclidos, también presentes de forma natural en el espacio solar, arrojados por el sol.

Las primeras fuentes de radiaciones ionizantes datan del año 1896 y emitían haces de electrones de elevada energía, de hasta 24 MeV, suficiente para atravesar alimentos de unos 15 cm de espesor (Urbain, 1989). A partir de 1990, surge una nueva perspectiva con el desarrollo de aceleradores de electrones equipados con electrónica en estado sólido. Estos aceleradores ofrecen ventajas tecnológicas en cuanto a rendimiento, flexibilidad (Brynjolfsson, 1989) y, de forma más importante, superación de objeciones de la sociedad a las fuentes de radionúclidos, lo que convierte a este tipo de radiación en una tecnología atractiva para su empleo en carnes a escala industrial (Renwick y Hansen, 1996).

La irradiación puede aplicarse con diferentes propósitos, siendo una de las aplicaciones más tentadora la higienización de alimentos, incluso se ha afirmado (Loaharanu, 1995) que es la única tecnología que puede garantizar la seguridad de algunos alimentos comercializados en fresco.

La irradiación de alimentos es un método físico de conservación que consiste en exponer el producto a radiaciones ionizantes (rayos X, gamma o electrones acelerados) con la suficiente energía para ionizar las moléculas que encuentra a su paso. El tratamiento se aplica al producto en el interior de una instalación protegida, normalmente laberíntica, para impedir el escape de radiaciones al medio industrial. Durante el proceso, prácticamente no hay aumento de temperatura, por lo que se trata de un método de tratamiento en frío (no

térmico), pudiéndose aplicar a alimentos ya envasados con las ventajas que ambas premisas supone. Si los alimentos se tratan ya envasados, es muy improbable que se produzca una contaminación posterior del producto.

Las modalidades aprobadas con este fin para su aplicación en alimentos por el Comité Mixto FAO/IAEA/WHO y, por tanto, reconocidas internacionalmente y autorizadas en la UE bajo la Directiva 1999/2/EC son las siguientes:

- Rayos gamma con energías de 1,17 y 1,33 MeV emitidos por radionúclidos de cobalto-60 (Co-60) o de 0,66 MeV emitidos por cesio-137 (Cs-137).
- Rayos X generados por equipos que operen con un nivel de energía de 5 MeV.
- Electrones acelerados generados por equipos a un nivel igual, o inferior, a 10 MeV.

Ninguno de los tres sistemas induce radioactividad a los niveles energéticos especificados.

Los rayos gamma son emitidos espontáneamente por ciertos elementos (en el caso de la irradiación de alimentos son el ^{60}Co y el ^{137}Cs) en los que se ha modificado la configuración estructural del núcleo, convirtiéndose en isótopos radioactivos. El primero se obtiene intencionadamente al exponer ^{59}Co al bombardeo con neutrones en un reactor nuclear, mientras que el ^{137}Cs es un subproducto de actividades de los reactores nucleares. Estos radionúclidos se caracterizan por una vida media de 5,26 años (^{60}Co) y 30,1 años (^{137}Cs) y emiten radiación gamma constantemente. Ambos tienen igual efectividad siempre que la cantidad de energía absorbida sea la misma. Su riesgo medioambiental es bajo, su coste es aceptable y ha dado resultados satisfactorios, por lo que se consideran adecuados para ser utilizados en la industria alimentaria (Aliste y col., 2000). La dosis absorbida por el material irradiado disminuye exponencialmente al aumentar el espesor del mismo, siendo la penetración inversamente proporcional a la densidad media del producto irradiado. En los alimentos de elevada humedad, la penetración de los rayos gamma en agua sirve como un buen modelo para estimar el poder de penetración en el alimento, habiéndose calculado una reducción de la dosis absorbida del 50% en una capa de agua de 10,8 cm y 8,2 cm para el ^{60}Co y el ^{137}Cs , respectivamente.

Los equipos industriales que existen utilizan mayoritariamente ^{60}Co a pesar de la ventaja que supone la mayor vida media del ^{137}Cs (potencialmente sería más rentable

porque el radionúclido tardaría más tiempo en sustituirse), debido, por una parte, a que el ^{137}Cs emite rayos gamma con una energía de aproximadamente la mitad que la del ^{60}Co y, por otra, la menor disponibilidad y la mayor dificultad para recuperarlo de los residuos radioactivos y purificarlo después (Cleland, 2006). Entre las operaciones normales del uso de equipos de radiación gamma, está la de aumentar el tiempo de exposición del material irradiado a medida que se desintegra el isótopo decayendo su actividad radioactiva, lo que habitualmente se realiza mediante el ajuste mensual del equipo, disminuyendo la velocidad de la cinta transportadora del producto. La fuente de isótopos emite rayos gamma en todas las direcciones y no se puede detener, por lo que los equipos deben funcionar continuamente para utilizar plenamente el material radioactivo.

Los **rayos X** se diferencian de la radiación gamma en que se generan artificialmente al hacer incidir un haz de electrones muy energéticos sobre una placa metálica (p. ej., de wolframio, oro, tungsteno) que provoca una desaceleración de los mismos, surgiendo los rayos X por el otro lado de la placa. Este choque produce un espectro continuo de rayos X a partir de cierta longitud de onda mínima dependiente de la energía de los electrones, pero una buena parte de la energía se disipa en forma de calor. No obstante, la eficiencia de la conversión de electrones en rayos X aumenta con el número atómico del material diana y con la energía del electrón. La radiación emitida no es uniforme, sino que se compone de una amplia gama de longitudes de onda, desde unos 10 nm hasta 0,001 nm, con un marcado límite inferior que corresponde a la energía máxima de los electrones empleados para el bombardeo. Los rayos X tienen también un gran poder de penetración aunque ligeramente menor que la radiación gamma. Sin embargo, la conversión de la energía eléctrica en rayos X es un proceso de escaso rendimiento, por lo que su utilización no resulta económicamente rentable para el tratamiento de alimentos, pero es posible que su incorporación en la industria sea mayor a medida que mejoren los avances tecnológicos. Es importante apuntar que, a diferencia de la radiación gamma, las instalaciones de rayos X pueden desconectarse a voluntad, ya que el funcionamiento de las mismas depende solamente de un interruptor de la corriente eléctrica.

Los **electrones acelerados** (partículas beta) son haces de electrones generados a partir de una corriente eléctrica catapultados por campos electromagnéticos que les incrementa su energía cinética en cada aceleración, abandonando el acelerador con una energía de 10 MeV (unas 9 veces mayor que con la que ingresaron) incidiendo en el material irradiado

que viaja perpendicularmente a la dirección del haz (figura 3.1). El acelerador lanza los electrones a gran velocidad y en menos de un segundo puede impartir la dosis que en un equipo de radiación gamma duraría algunas horas. Una ventaja de los aceleradores de electrones, al igual que los de rayos X, es la posibilidad de conectar y desconectar la fuente de electrones de acuerdo con las necesidades. Los haces de electrones acelerados permiten tratar los alimentos a bajo coste. Además, el control del tratamiento es preciso, su utilización es segura y su rendimiento energético es elevado. Por contra, tienen el inconveniente de tener un poder de penetración limitado (de 6 a 8 cm) en comparación con la radiación gamma y los rayos X. Para subsanar esta deficiencia, los alimentos pueden irradiarse distribuidos en finas capas, de no más de 8 cm, realizando un tratamiento bilateral o disponer de un sistema de volteo (Satin, 2002; Brewer, 2004). El poder de penetración varía en función de la energía del electrón, así resulta más ventajoso usar energías de hasta 10 MeV para alimentos envasados, los cuales pueden tener una densidad media de $0,8 \text{ g/cm}^3$ y para la irradiación de granos o fluidos se pueden usar niveles inferiores de energía (5 MeV), ya que se puede controlar el espesor de la capa para optimizar la penetración de la radiación (Cleland, 2006). En cualquier caso, su uso es limitado para tratar envases de gran capacidad.

Las radiaciones ionizantes más aceptadas por parte del consumidor son los rayos X y los electrones acelerados (Rahman, 1999), siendo éstas últimas las que presentan mayor interés en la conservación de los alimentos en la actualidad (Moy, 2005).

La irradiación no debe confundirse con la contaminación de alimentos por materiales radioactivos, los cuales emiten radiaciones que pueden dañar la salud de la población expuesta a las mismas. La irradiación de alimentos no puede producir radioactividad inducida en los alimentos a las dosis autorizadas de 10 kGy, ni siquiera incluso hasta 50 kGy (Terry y McColl, 1992; Diehl, 1995). Sin embargo, cuando el tratamiento se aplica a dosis máximas de 10 kGy, puede ocasionar pérdidas parciales de nutrientes y algunas modificaciones de las propiedades sensoriales pero no más que otros métodos de procesado que se emplean habitualmente, como el cocinado, pasteurización, esterilización, etc.

1.12.4 Dosimetría

En el caso de la irradiación, la intensidad del tratamiento viene determinada por la “dosis absorbida” como expresión de la energía que el material absorbe por unidad de masa. La

unidad en el Sistema Internacional es el julio/kilogramo (J/kg) y recibe el nombre de gray (Gy). El Gy, por tanto, se define como una irradiación tal que transfiere 1 julio de energía por kilogramo de producto. El sistema internacional de unidades admite también el sievert (Sv) para medir la dosis absorbida por los sistemas biológicos; la unidad es equivalente a 1 J/kg. La diferencia con el Gy es que el sievert está corregido por el daño biológico que producen las radiaciones.

Cuando a mediados del siglo XX se desarrolló el tratamiento de alimentos con radiaciones ionizantes, se acuñaron tres términos por analogía a los procesos térmicos: radapertización (equivalente a esterilización, requiere dosis de 10-50 kGy), radurización (dosis de 0,4-10 kGy) y radicación (dosis de 0,1-8 kGy) (Ohlsson y col., 2002), los dos últimos equivalentes a la pasteurización, el primero referido a aumentar la vida útil de alimentos y el segundo destinado a eliminar patógenos no esporulados (higienización).

Estos términos cada vez están más en desuso y se prefiere, de acuerdo con la IAEA, diferenciar tres intervalos de dosis que corresponden con sendas aplicaciones generales:

Dosis bajas (hasta 1 kGy)

- Prevención de germinación y brote de patatas, cebollas, ajos y otras hortalizas (0,05-0,15 kGy).
- Desinsectación de granos, frutas, hortalizas y frutos secos (0,15-1,0 kGy).
- Demora de la maduración y envejecimiento de hortalizas y frutas (0,2-1,0 kGy).
- Desparasitación (parásitos de elevada resistencia) de carnes (2,0-6,0 kGy).

Dosis medias (de 1 a 10 kGy)

- Reducción de la carga microbiana en hierbas y especias deshidratadas (3-10 kGy).
- Desparasitación (parásitos de baja resistencia) de carnes (0,5-1,0 kGy).
- Prolongación de la vida útil en pescado, marisco, carnes frescas y carnes de aves de corral mediante la destrucción de microorganismos alterantes (1,0-5 kGy).
- Prevención de enfermedades de transmisión alimentaria mediante la eliminación de microorganismos patógenos no esporulados (higienización) (1,0-3,0 kGy).
- Mejoras en las propiedades tecnológicas del alimento (2,0-7,0 kGy).

Dosis altas (de 10 a 50 kGy)

- Destrucción de bacterias esporuladas (esterilización).

Esta clasificación permite agrupar con mayor exactitud los efectos y objetivos conseguidos. El uso de la irradiación para la esterilización de alimentos requiere dosis netamente superiores a 10 kGy, debido a la gran resistencia que muestran las esporas bacterianas frente a las radiaciones ionizantes. Por ello, hoy por hoy no es posible aplicarla de forma comercial, quedando restringida a situaciones concretas, por ejemplo, esterilización de alimentos para vuelos espaciales especiales (dispensa de la FDA) o pudiera ser útil también para la preparación de dietas estériles para hospitales.

1.13 EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES EN LOS MICROORGANISMOS

Se ha demostrado que el tratamiento de los alimentos con radiaciones ionizantes es un método seguro y efectivo para reducir o eliminar peligros biológicos que pudieran estar presentes en los alimentos (WHO, 1994). Se ha mostrado, asimismo, que el proceso permite descontaminar alimentos con una mayor o menor eficacia, dependiendo de la dosis utilizada. El consenso de la comunidad científica (FAO/IAEA/WHO, 1981; WHO, 1994; FDA, 1999; AESA, 2005b; EFSA, 2011a; AESAN, 2013) sobre la seguridad de la irradiación sugiere que esta tecnología es muy útil para eliminar efectivamente muchos peligros biológicos asociados a los alimentos sin que se produjeran efectos adversos y, al tiempo, aumentar la vida útil de los mismos.

La radiación, tanto ionizante como no ionizante, destruye los microorganismos mediante el daño que ocasiona, la mayoría de las veces, en el material genético como resultado de la incidencia directa de la energía radiante en la doble hélice del ADN, o como resultado de la ionización de una molécula adyacente, habitualmente el agua, produciéndose radiolisis y peróxidos (Grecz y col., 1983; Rahman, 2002; Jay y col., 2009). En este caso, son los radicales libres transitorios que se generan los que interaccionan con el material genético (Mendonca, 2002). Son compuestos altamente reactivos que reaccionan con los ácidos nucleicos y con los enlaces entre varios ácidos nucleicos de una misma hélice o entre distintos pares de bases de una hélice y otra. Como consecuencia, se impiden el crecimiento microbiano y numerosas funciones, llegando a ocasionar la muerte celular (Mendonca, 2002).

Además de los efectos sobre el material genético, la radiación puede interaccionar con otros componentes celulares, como membranas, enzimas y elementos citoplasmáticos,

provocando efectos deletéreos. Estas interacciones por sí mismas pueden ser letales para la célula, pero en la mayoría de los casos son más bien reversibles, a menos que también existiera daño del material genético (Dickson, 2004), lo que puede estar relacionado de forma decisiva con la supervivencia de las bacterias lesionadas subletalmente, ya que una célula sin daño genético letal puede ser inactivada mediante otras formas que complican o impiden la supervivencia de la célula lesionada.

Dado que la inactivación de los microorganismos producida por la irradiación se debe fundamentalmente al daño ocasionado en el ADN, los mecanismos de supervivencia y recuperación se centran en la reparación del ADN, siendo más resistentes los microorganismos que más fácilmente pueden solventar los efectos deletéreos. Un ejemplo es el de *Deinococcus radiodurans* (anteriormente denominada *Micrococcus radiodurans*), en alimentos tratados con radiación ionizante (Brooks y Murray, 1981) a dosis de 35-40 kGy. En 1976 ya se informó de la eficiencia del sistema de reparación enzimática del ADN en esta bacteria (Moseley, 1967). Se ha observado que la bacteria antes citada tiene cuatro genomas, lo que hace suponer que cuando la bacteria se expone a la radiación, el ADN extra, ante un daño por el tratamiento, no tenga que sintetizar nuevo genoma (Battista, 1997). No obstante, el mecanismo preciso de la radorresistencia no está aun totalmente aclarado (Jay y col., 2009).

1.13.1 Destrucción de los microorganismos mediante radiaciones ionizantes

La cinética de destrucción microbiana frente al tratamiento de irradiación se ajusta a una cinética de primer orden, al igual que ocurre mediante la aplicación de un tratamiento térmico. El parámetro que define la muerte es el valor D (dosis necesaria para reducir la población bacteriana en un 90%) y se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$D = \frac{d}{\log N_0 - \log N}$$

Donde:

D = dosis de reducción decimal

d = dosis de radiación absorbida

N_0 = número de microorganismos originalmente presente

N = número de microorganismos después del tratamiento

El valor D se calcula habitualmente a partir de la representación gráfica del logaritmo del número de supervivientes en función de la dosis absorbida; se expresa en grays y matemáticamente es el inverso de la pendiente de la ecuación de la recta que define la cinética de muerte.

Aunque normalmente la inactivación microbiana por irradiación sigue un curso exponencial, en ocasiones se presentan “hombros” y “colas”, al igual que en las curvas de muerte térmica. Los hombros aparecen a dosis bajas de irradiación y es más común en microorganismos muy resistentes a este tratamiento, como *Deinococcus* (Sweet y Moseley, 1976). Este hecho podría deberse a una acumulación de lesiones en el ADN u otras estructuras que la célula puede reparar y, una vez subsanada la lesión causada por el tratamiento, cuando se aplican dosis bajas, el hombro desaparece y el número de microorganismos disminuye exponencialmente al aumentar la dosis aplicada. Respecto a la aparición de colas, las explicaciones son generalmente poco satisfactorias, pero se ha hipotetizado que se trata de una respuesta al estrés medioambiental (Dickson, 2004). Para describir este tipo de comportamiento se recurre normalmente a modelos matemáticos no lineales, como los empleados en la distribución de Weibull (Mayer-Miebach y col., 2005).

1.13.2 Sensibilidad de los microorganismos frente a las radiaciones ionizantes y factores de los que depende

Son numerosos los trabajos realizados sobre la radiorresistencia de los microorganismos. En la tabla 1.6 se recogen valores D para algunos microorganismos en diferentes matrices alimentarias. Como puede observarse, existe una amplia variación respecto a la sensibilidad microbiana frente a la irradiación, pudiendo ordenarse, de más a menos resistente, como virus > esporas bacterianas > bacterias Gram positivas > bacterias Gram negativas > mohos y levaduras > parásitos. La elevada resistencia que presentan las esporas (Monk y col., 1995), se debe posiblemente a su bajo contenido en humedad, inferior al 10%, frente al 70% que presentan las formas vegetativas (Dickson, 2004). Los niveles reducidos de humedad minimizan los efectos secundarios de la radiación, resultando en un aumento de la resistencia (Dickson, 2004). De igual forma, hay hongos que presentan una resistencia similar a la de las esporas (Farkas, 2006). Los virus requieren mayores dosis de radiación para su inactivación (Crawford y Ruff, 1996; Beguiristain y col., 2011; Cambero y col., 2013), habiéndose descrito que se requieren 16 kGy para reducir los niveles del virus MNV-1 alrededor de 4 unidades logarítmicas (Beguiristain y

col., 2011). Por otra parte, las dosis superiores a 10 kGy son inaplicables en los alimentos dado que es el límite máximo permitido por los organismos internacionales, por ejemplo la EFSA, WHO/FAO y IAEA. Además, tales dosis provocarían cambios manifiestos en la estructura y características propias (texturales y sensoriales) de la carne y productos cárnicos.

Respecto a las bacterias alterantes, presentan diferente sensibilidad, siendo extremadamente sensible *Pseudomonas putida* (Monk y col., 1995). Por el contrario, el artículo de este mismo autor ofrece valores D muy elevados para *Clostridium sporogenes*, *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp., y *Micrococcus radiodurans*.

Tabla 1.6 Valores D para algunos microorganismos en diferentes matrices alimentarias

Gram positivas

Bacteria	Medio	Condiciones	Valor D (kGy)	Ref.
Formadores de esporas				
<i>Bacillus cereus</i>	Queso Mozzarella	– 78°C, aire	3,6	1
	Yogur	–78°C	4	1
<i>Clostridium botulinum</i>	Estofado carne de vaca	20-25°C	1,4	2
<i>Clostridium botulinum</i>	Pollo	–30°C	3,36	2
<i>Clostridium perfringens</i>	Agua	20-25°C	1,2-1,3	3
No formadores de esporas				
<i>Listeria monocytogenes</i>	Pollo	2-4°C	0,77	3
	Pollo	12°C	0,49	4
	Carne picada de vaca	12°C	0,5-1,0	5
	Carne picada	–18°C	1,06	6
	Mozzarella	–78°C	1,4	7
	Helado	–78°C	2	7
<i>Listeria innocua</i>	Lomo de cerdo fresco	MAP	0,43	8
	Lomo de cerdo adobado	MAP	0,9	9
	Jamón cocido		0,49	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aves de abasto	10°C	0,42	11
	Carne		0,86	12
	Carne de pollo	0°C	0,36	12
	Carne de vaca	-30°C	0,95	13

Tabla 1.6 (Continuación)

Gram negativas

Bacteria	Medio	Condiciones	Valor D (kGy)	Ref.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Pescado triturado	2°C	0,16	14
	Pescado triturado	-15°C	0,274	14
	Carne de vaca	2°C	0,14-0,19	14
<i>Campylobacter jejuni</i>	Caldo BHI	0-5°C	0,27	15
	Carne picada de pavo	0-5°C, vacío	0,19	15
	Carne de vaca	2-4°C	0,18	16
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Carne picada de vaca	-17°C	0,307	16
	Carne de vaca	-30°C	0,59	13
	Carne picada de vaca	2-5°C	0,241	16
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Salsa	3°C	0,416	17
	Carne de vaca asada	3°C	0,567	17
	Carne picada de vaca	20°C	0,55	18
	Pollo deshuesado	-40°C	0,497	
	Pollo deshuesado	-40°C	0,533	19
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Pollo deshuesado	-40°C, aire	0,534	19
	Carne de vaca	-30°C	1,07	13
<i>Salmonella</i> Newport	Pollo deshuesado	-40°C, aire	0,436	19
<i>Salmonella</i> Anatum	Pollo deshuesado	40°C, aire	0,542	19
<i>Salmonella</i> Seftenberg	Huevo líquido	congelado	0,47	19
<i>Salmonella</i> Gallinarum	Huevo líquido	congelado	0,57	20
<i>Shigella dysenteriae</i>	Ostras		0,4	21
	Carne de cangrejo		0,35	21
<i>Shigella flexneri</i>	Ostras		0,26	21
	Carne de cangrejo		0,22	21
<i>Shigella sonnei</i>	Ostras		0,25	21
	Carne de cangrejo		0,27	21
<i>Vibrio cholerae</i>	Langostinos	congelados	0,11	22
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gamba congelada		0,1	23
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Carne picada de vaca	25°C	0,2	24
	Carne picada de vaca	-30°C	0,39	24
	Carne picada		0,1-0,21	25
<i>Serratia marcescens</i>	TF	aire	0,037	26
<i>Pseudomonas</i> spp.	TF	aire	0,045	27
<i>Proteus vulgaris</i>	TF	aire	0,067	27
<i>Acinetobacter</i> sp.	TF	aire	0,34	28
<i>Alcaligenes</i> sp.	TF	aire	0,31	29
<i>Moraxella</i> spp.	Carne de vaca	-30°C	0,016	13

TF: tampón fosfato

1. Hashisaka y col., 1990; 2. Anellis y col., 1977; 3. Huhtanen y col., 1989; 4. Patterson, 1989; 5. El Shenawy y col., 1989; 6. Stegeman, 1988; 7. Hashisaka y col., 1989; 8. García-Márquez y col., 2012a; 9. García-Márquez y col., 2012b 10. Cabeza y col., 2007; 11. Erdman y col., 1961; 12. Thayer y Boyd, 1992; 13. Maxcy y col., 1976; 14. Palumbo y col., 1986; 15. Lambert y Maxcy, 1984; 16. Clavero y col., 1994; 17. Grant y Patterson, 1992; 18. Tarkowski y col., 1984; 19. Thayer y col., 1990; 20. Ley y col., 1963; 21. Quinn y col., 1967; 22. Hau y col., 1992; 23. Bandekar y col., 1987; 24. El-Zawahry y Rowley, 1979; 25. Kampelmacher, 1983; 26. Watts y col., 1975; 27. Lewis y col., 1971; 28. Ito y col., 1973; 29. Matsuyama y col., 1964.

Entre las bacterias de interés sanitario, las Gram positivas son, en general, ligeramente más radiorresistentes que las Gram negativas, con valores D comprendidos entre 0,4 y 1 kGy para las primeras (Tarkowski y col., 1984; Palumbo y col., 1986; Thayer y col., 1990; Grant y Patterson, 1992; Sommers y col., 2002; Cabeza y col., 2007; Cabeza y col., 2010) frente a los 0,1-0,4 kGy obtenidos para las Gram negativas (Huhtanen y col., 1989; Thayer y Boyd, 1992; Cabeza y col., 2009; Cambero y col., 2012). *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, ambas Gram positivas, son las que presentan mayor resistencia, habiéndose publicado valores D (dosis absorbidas) máximos en carne de 0,9 (Patterson, 1989) y de 0,86 kGy (Thayer y Boyd, 1992), respectivamente. En segundo lugar, figuran las diversas especies del género *Salmonella*, con valores D máximos de 0,57 kGy en carne asada de vacuno (Grant y Patterson, 1992). Esta bacteria se puede multiplicar en el lomo de cerdo hasta niveles peligrosos desencadenando un brote de salmonelosis (Anónimo, 1986). *S. Typhimurium* es de los serovares más resistentes de este género, con parámetros próximos a los de las Gram positivas, habiéndose descrito valores D en carne, pollo, jamón ibérico, cecina, salchichón y chorizo, del orden de 0,5 kGy (Tarkowski y col., 1984; Thayer y col., 1990; Grant y Patterson, 1992; Ordóñez y col., 2007; Cabeza y col., 2009; Cambero y col., 2012) e incluso de 0,67 kGy en mojama de atún (Cambero y col., 2012), frente a *S. Enteritidis* para la que se han publicado valores D del orden de 0,4 kGy en salchichón y chorizo (Ordóñez y col., 2007; Cabeza y col., 2009). En general, *Salmonella* spp. presentan una radiorresistencia similar a *L. monocytogenes* (Fu y col., 1995; Grant y Patterson, 1995; Thayer y col., 1995). Los experimentos realizados al efecto han mostrado que, dependiendo de las condiciones experimentales, unas veces es más resistente *Salmonella* que *Listeria*, y otras lo contrario (Grant y Patterson, 1992, 1995; Fu y col., 1995; Thayer y col., 1995; Farkas, 1998; Doyle, 1999).

Las restantes especies no esporuladas de interés sanitario son bastante más sensibles a la radiación. Así, por ejemplo, *Y. enterocolitica*, microorganismo anaerobio facultativo que puede crecer a 4 °C y que se encuentra frecuentemente en carne de cerdo y derivados, presenta valores D del orden de 0,1-0,2 kGy (El-Zawahry y Rowley, 1979; Kampelmacher, 1983) frente a los 0,35-0,5kGy obtenidos para *L. monocytogenes* (Cabeza y col., 2007, 2009) en jamón cocido. Su tasa de crecimiento es mayor en atmósferas enriquecidas en CO₂, alcanzando niveles muy elevados al final de su almacenamiento, por lo que su presencia en carne fresca puede suponer un peligro microbiológico (Thippareddi y col., 1995). La radiorresistencia de *E.coli* O157:H7 es similar a la calculada para otros serotipos

de esta especie (Roberts, 1998), habiéndose conseguido 5,36 reducciones decimales mediante la aplicación de 1,5 kGy en medios óptimos y a temperatura de refrigeración (Rossi y col., 2009) y los datos que se han descrito de valores D son muy bajos, inferiores a 0,30 kGy (Thayer y Boyd, 1993; Clavero y col., 1994; Buchanan y col., 1998; Chirinos y col., 2002; Cambero y col., 2012). Según la USDA/FSIS (1993), este microorganismo se encuentra en la carne a niveles inferiores a 15 células/gramo, por lo que estas 6 reducciones serían suficientes para disminuir su presencia hasta niveles seguros (Thayer y Boyd, 1993; Clavero y col., 1994), lo que se ha confirmado en alimentos listos para su consumo, siendo suficiente una dosis de 0,72 kGy para alcanzar el objetivo de seguridad alimentaria (del inglés, *Food Safety Objective*, FSO) de acuerdo al criterio microbiológico de “tolerancia cero” en productos microbiológicamente estables, como el jamón ibérico, la cecina y la mojama de atún (Cambero y col., 2012).

La eficacia letal de la radiación depende fundamentalmente del tipo y naturaleza del microorganismo, de su carga inicial en el alimento, de las condiciones de cultivo antes del tratamiento, de la fase fisiológica y del estado en que se encuentra. Sin embargo, además de la radiorresistencia inherente a cada microorganismo, dicho efecto también resulta afectado por factores relacionados con las condiciones de tratamiento y la matriz en la que se encuentra dicho microorganismo (Frazier y Westhoff, 1988). El factor ambiental más importante es la temperatura a la que tiene lugar el tratamiento. El efecto de este agente queda muy claro si se observan los resultados de la aplicación de las radiaciones a temperaturas de congelación y por encima de ella. Quizás, una de las mejores ilustraciones de este efecto es la obtenida con *E. coli* O157:H7, donde el valor D hallado por Thayer y Boyd (1993) casi es el doble a 5 °C (0,28 kGy) que a -5 °C (0,44 kGy). Los valores D fueron relativamente constantes a temperaturas por encima de 0 °C y también fueron constantes (pero superiores a los anteriores) a temperaturas de irradiación por debajo de 0 °C (Ley, 1983). Este efecto se ha explicado como una consecuencia del estado de las moléculas de agua en la célula. Cuando predomina el agua en estado sólido se atenúan los efectos secundarios o indirectos de la radiación (Ley, 1983). Otros factores ambientales pueden afectar también a la radiorresistencia de los microorganismos. La composición del medio en que el microorganismo se halla tiene un profundo efecto en la respuesta frente a las radiaciones. Diferentes autores han observado que *L. monocytogenes* presenta mayor radiorresistencia en carne que en medios de cultivo (Andrews y col., 1995; Gursel y Gurakan 1997). Los compuestos que se combinan con los grupos sulfhidrilos son más

sensibles al tratamiento. El efecto del oxígeno atmosférico varía dependiendo del microorganismo. Por ejemplo, la evacuación completa de oxígeno de un medio con células de *E. coli* en suspensión triplica la resistencia a las radiaciones ionizantes (Niven, 1958). Por otra parte, se minimizan, obviamente, los efectos oxidativos.

A la hora de aplicar un tratamiento de irradiación para la higienización de un determinado producto también es necesario considerar, además del microorganismo diana, la temperatura de almacenamiento de dicho producto durante su transporte y distribución hasta su consumo. Si se produce una interrupción en la cadena de frío, el alimento queda expuesto a un abuso de temperatura durante un periodo de tiempo más o menos prolongado, lo que ofrece a determinados microorganismos, como *Salmonella* spp. y *S. aureus*, la oportunidad de multiplicarse llegando a alcanzar niveles peligrosos para el consumidor. En el caso de *L. monocytogenes*, debido a su carácter psicrotrofo, no sólo es necesario reducir su número hasta niveles no infectivos, sino que además hay que tener en cuenta el tiempo de almacenamiento bajo refrigeración que se espera del producto irradiado.

1.14 EFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES EN LOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS

Los procesos tecnológicos que se aplican a los alimentos para garantizar la seguridad de los mismos o para ampliar su vida útil provocan siempre efectos colaterales más o menos profundos dependiendo de la agresividad de la tecnología utilizada, lo que conlleva la modificación de las propiedades propias que caracterizan al alimento genuino. Es necesario, pues, llegar a un compromiso en la intensidad del tratamiento para alcanzar el objetivo que se pretende y evitar al máximo los efectos secundarios. La tecnología de radiaciones ionizantes no es ajena a este modelo.

Las modificaciones químicas que se producen en el alimento debido a la aplicación de rayos gamma, rayos X o electrones acelerados, derivan de la interacción de la energía radiante con el producto dando lugar a transformaciones de ciertos compuestos químicos, siempre en cantidades pequeñas, debidas a efectos radiolíticos primarios y secundarios. En los últimos años, se han realizado diversos estudios sobre el tema (Arvanitoyannis y col., 2009a, 2009b, 2010) y se han emitido opiniones científicas por instituciones nacionales e internacionales, como la de EFSA (2011b). Los productos que se han descrito de forma

general son diversos hidrocarburos procedentes de los ácidos grasos mayoritarios y furanos a partir de carbohidratos y ácido ascórbico (vitamina C) (Fan, 2005). No obstante, estas sustancias pueden detectarse también en alimentos sometidos a otros procesos tecnológicos como, por ejemplo, los tratamientos térmicos y, por otra parte, las tasas de dichas sustancias halladas en alimentos irradiados no son mayores que las que se han determinado en los alimentos tratados con otras tecnologías, fundamentalmente los tratamientos térmicos. Merece especial mención las 2-alquilciclobutanonas (2-ACB) que, al parecer, son específicas de los alimentos tratados con radiaciones ionizantes, aunque se han detectado en anacardos y nuez moscada frescos (Variyar y col., 2008), pero al no haberse descrito en otros productos naturales parece pertinente tratar este hallazgo con alguna cautela hasta que se confirmen los resultados (EFSA, 2011b).

Aunque las modificaciones anteriores sean las más evidentes, no cabe duda que, dada la complejidad química de los alimentos, otros muchos compuestos están expuestos a las radiaciones y pueden sufrir transformaciones químicas. En los párrafos siguientes se hace un breve estudio de los mismos.

1.14.1 Lípidos

La irradiación de lípidos ocasiona diversas reacciones químicas cuya intensidad depende, aparte de la dosis aplicada, de múltiples factores (Delincée, 1983), específicamente de la concentración lipídica, estado físico (líquido o sólido), perfil de insaturación de los ácidos grasos, presencia de antioxidantes, condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad del producto, pH) y condiciones del envasado y almacenamiento (temperatura, tiempo, luz, composición de la atmósfera y temperatura).

En términos generales, la irradiación acelera el proceso de oxidación lipídica, algo que es más relevante en alimentos con un elevado contenido graso y con ácidos grasos muy insaturados, en los que se forman numerosos radicales libres debido a esa oxidación (O'Bryan y col., 2008). Se ha observado (Nam y col., 2003) un aumento de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en carne picada de bovino tratado con electrones acelerados (2,5 kGy). El uso de bajas temperaturas, la presencia de oxígeno, antioxidantes y un adecuado material de envase minimizan la oxidación lipídica (Merritt y col., 1978; Stefanova y col., 2010). Ciertos polifosfatos, como el tripolifosfato sódico, son excelentes quelantes de metales y, por tanto, se comportan como inhibidores de los fenómenos

autooxidativos. También el envasado a vacío o en una atmósfera controlada, y la adición de ácidos orgánicos (cítrico y ascórbico) a la carne fresca, pueden ser una estrategia para minimizar cambios en el color de la carne irradiada. El ascórbico, por su mayor efecto antioxidante en condiciones aeróbicas, es más eficaz que el cítrico en el aspecto que se comenta (Nam y Ahn, 2002; Ahn y col., 2013). No obstante, los antioxidantes no siempre pueden evitar la percepción mediante el olfato de los cambios sensoriales producidos por sustancias volátiles, como las azufradas, ya que el umbral de detección de dichas sustancias es muy bajo.

Ya se ha comentado antes que los compuestos más característicos generados durante la irradiación de alimentos son las 2-ACB y ciertos hidrocarburos. Las primeras surgen al liberarse el radical acilo de los triacilglicérols de modo que las 2-ACB tienen el mismo número de átomos de carbono que el ácido graso de procedencia y el grupo alquilo localizado en la posición 2 del anillo (Letellie y Nawar, 1972). Así, la 2-dodeciloclobutanona (2-dodecilCB) proviene del palmítico, pero si es el esteárico el ácido graso afectado rendiría la tetradecilCB, y de los insaturados de 18 átomos de carbono (oleico, linoléico y linoléico) se formarían las 2-ACB con los correspondientes dobles enlaces, resumidamente, tetradecil-, tetradecen-, tetradien- y tetratrien-). Estos compuestos tienen también importancia al poder utilizarse como marcadores para averiguar si un alimento ha sido, o no, irradiado. Particularmente, se han investigado las 2-dodecilCB y las 2-tetradecilCB (Obana y col., 2006; Zanardi y col., 2007; Lee y col., 2008; Blanch y col., 2009), habiéndose observado (Tewfik y Tewfik, 2008) un descenso lineal del 50% en la concentración de esas 2-ACB en carnes irradiadas de vacuno y pollo durante un almacenamiento de un año a -20 °C y, por otra parte, se ha descrito también la estabilidad de las 2-ACB en alimentos térmicamente tratados incluso a 100 °C aunque se descomponen a 200 °C (Obana y col., 2006). De hecho, algunos organismos reguladores han incorporado en su normativa el análisis de estos compuestos como prueba química de referencia para la detección de alimentos irradiados (método estándar europeo EN1785:2003).

Los enlaces *éster* glicerol-ácidos grasos de los triacilglicérols pueden escindirse durante el tratamiento con radiaciones ionizantes principalmente en las posiciones *sn-1* y *sn-2*, rindiendo, si era saturado, hidrocarburos con un átomo de carbono menos y con dos átomos de carbono menos y un doble enlace, respectivamente. (Nawar y col., 1990). Por

ejemplo, del palmítico (C-16:0) se formaría el pentadecano (C-15:0) si se escinde el enlace *sn-1* o el tetradeceno (C-14:1, Δ^1) si se rompe el de la posición *sn-2*. Del linoleico (C-18:2), surgiría el heptadecadieno (C-17:2, $\Delta^{6,9}$) o el hexadecatrieno (C-16:3, $\Delta^{1,7,10}$). Este fenómeno ha sido estudiado por otros investigadores (p. ej., Morehouse y Ku, 1993; Chung y col., 2004) y al igual que las 2-ACB, la determinación de hidrocarburos se ha adoptado en la UE como prueba analítica de referencia para detectar alimentos irradiados (EN1784:2003).

Otro efecto que puede derivarse de la irradiación es la isomerización de las conformaciones *cis-trans*, por lo que en los alimentos irradiados podrían aparecer ácidos grasos *trans*, incluso a dosis absorbidas inferiores a 8 kGy (Brito y col., 2002). Yilmaz y Gecgel (2007) observaron un aumento de ácidos grasos *trans* en carne picada de ternera tratada con radiaciones ionizantes. En este mismo estudio se observaron modificaciones del perfil de ácidos grasos de la carne cuando se aplicaron dosis iguales o superiores a 5 kGy, caracterizadas por un incremento de los saturados (C16:0, C17:0, C18:0, y C20:0), mientras que se redujo el contenido de monoinsaturados (C14:1, C15:1, C18:1, y C20:1) y poliinsaturados (C18:2, C18:3 y C22:2), con el consiguiente incremento de la relación ácidos grasos saturados/insaturados.

En general, los ácidos poliinsaturados son más susceptibles a las transformaciones químicas que los monoinsaturados y los saturados (Khayat y Schwal, 1983) y en diversos trabajos se ha detectado que la irradiación produce una reducción significativa de los ácidos grasos poliinsaturados en el alimento (Ahn y col., 2013). Hau y Liew (1993) estudiaron el efecto del tratamiento de irradiación a una dosis de 10 kGy en el contenido de ácido linoleico y linolénico de un crustáceo marino (*Palaemon monodom*) y observaron únicamente disminución del ácido linoleico.

La oxidación del colesterol puede rendir compuestos afines con grupos hidroxilo, cetona o epóxido (Tai y col., 1999; Savage y col., 2002), los denominados óxidos del colesterol (COPs), pero no hay evidencias de un aumento de los mismos en los alimentos irradiados (EFSA, 2011b). De hecho, algunos autores (Nam y col., 2001; Farkas y col., 2009) no han encontrado en carne irradiada tasas superiores a las determinadas en las muestras controles.

1.14.2 Proteínas

Dejando al margen la dosis aplicada en el tratamiento con radiaciones ionizantes, que evidentemente es un factor relevante al respecto, los efectos de esta tecnología en las proteínas dependen de su estructura (globular, fibrosa), estado (nativo o desnaturalizado), naturaleza física, composición aminoacídica y presencia de otras sustancias en el alimento (EFSA, 2011b). Se pueden dar reacciones de desnaturalización, asociación, desaminación y descarboxilación (Diehl, 1990; Dogan y col., 2007), reducción de enlaces disulfuro, oxidación de grupos tiol, rotura de enlaces peptídicos y cambios de estados de valencia de los iones metálicos coordinados en las enzimas (Delincée, 1983). Se ha observado, por ejemplo, que en trufas tratadas a 2 kGy se modifica el perfil proteico, apareciendo polipéptidos de 20-37 kDa (Nazzaro y col., 2007), lo que puede afectar su potencial alergénico. La irradiación puede producir también productos radiolíticos de bajo peso molecular derivados de los péptidos, tales como amoniaco, ácidos cetónicos y productos afines a las amidas y diaminoácidos (EFSA, 2011b). En el caso de enzimas monoméricas, es importante apuntar que no se desactivan por la irradiación, necesitando otros tratamientos (los térmicos, por ejemplo) para que pierdan su actividad (Delincée, 1983).

A pesar del espectro descrito, puede decirse que los principales cambios inducidos por la irradiación de proteínas afectan a los aminoácidos, siendo los aromáticos y azufrados los más sensibles. Así, a partir de la fenilalanina se producen tres isómeros de la tirosina (*orto*, *meta* y *para*-tirosina) y también puede dar lugar, al igual que la cisteína (Delincée, 1983), a α,α' -diaminoácidos (Hein y col., 2000; EFSA, 2011b). Sin embargo, este efecto se reduce cuando las dosis son bajas, como se ha demostrado en algunos estudios. Por ejemplo, en carne de cerdo y pechuga de pollo irradiadas se mantienen estables la mayoría de los aminoácidos a dosis de hasta 5 kGy (Partmann y Keskin, 1979) y en otros más sensibles, como la cistina, metionina y triptófano, apenas hay cambios destacados incluso hasta 71 kGy (Josephson y col., 1978). Para Thayer (1987), la irradiación de la carne a dosis permitidas (2-7 kGy) no tiene efecto significativo en el valor nutricional de las proteínas o aminoácidos.

1.14.3 Carbohidratos

La irradiación produce modificaciones en los mono- y polisacáridos a las dosis autorizadas por la legislación, dando lugar a aldehídos, ácido fórmico y peróxido de hidrógeno

(Frejaville y Saintlebe, 1981; Raffi y col., 1981; Fan, 2003). Por ejemplo, se ha informado que la irradiación (6,2 kGy) de maíz, trigo, arroz o patata induce la formación, a partir del almidón, de malonaldeído, formaldeído, acetaldheído, ácido fórmico y peróxido de hidrógeno entre otros productos radiolíticos en menor cuantía (Raffi y col., 1981) y, más recientemente, se han detectado los mismos aldehídos en soluciones de fructosa, glucosa y sacarosa (Fan, 2003) y almidón (Fan, 2005) irradiados con dosis de 3 kGy.

En alimentos RTE que contenían glucosa, fructosa o sacarosa se ha observado (Fan, 2005) la formación de furanos cuando se irradiaron a dosis de 5 kGy en unos niveles ligeramente superiores que cuando se esterilizaron en autoclave durante 25 min (2-7 ng frente a 0-3 ng). La formación de estas sustancias es mayor a bajos pHs y cuando el contenido de azúcares es elevado. Se ha observado (Fan, 2005; Fan y Sommers, 2006) que la irradiación a dosis de 4,5 kGy de soluciones acuosas de glucosa, miel, jarabe de almidón, ascorbato sódico y eritorbato sódico indujo la formación de furanos, pero la adición de nitrito sódico a estas soluciones antes del tratamiento eliminó totalmente, o redujo significativamente, la formación de furanos. En productos cárnicos RTE (salchichas frankfurt y boloña de pavo y vacuno, jamón cocido) que contenían estos ingredientes no se detectaron diferencias significativas en el contenido de furanos respecto a los controles en la mayoría de las muestras cuando se aplicaron dosis de 4,5 kGy en estado refrigerado (5 °C) o 10 kGy en el producto congelado (-18 °C). Además, en salchichas frankfurt tratadas térmicamente para su elaboración, se redujo el contenido de los furanos que se habían formado (6 - 9 ng/g) cuando se irradiaron.

1.14.4 Vitaminas

La irradiación de los alimentos provoca pérdidas de vitaminas de manera similar a otros tratamientos, principalmente térmicos (Liu y col., 1991). La sensibilidad a la radiación depende del tipo de vitamina, siendo las hidrosolubles las más sensibles. Dentro de ellas, la tiamina muestra la mayor susceptibilidad, habiéndose observado pérdidas elevadas en carnes (Stewart, 2009), especialmente en la de cerdo, donde su contenido puede reducirse hasta en un 40% con dosis de 4,5 kGy. Por otro lado, la riboflavina, vitamina B₆, vitamina B₁₂ y niacina parecen ser bastante radiorresistentes (Fox y col., 1989), no habiéndose observado pérdidas de riboflavina en chuletas de cerdo ni en pechugas de pollo irradiadas con dosis de hasta 6,6 kGy, incluso en algunas muestras hubo un aumento del 25% en la concentración de esta vitamina (Kilcast, 1994), lo que puede deberse a una conversión de

los precursores en vitamina activa inducida por las radiaciones o a una mayor extracción por el método analítico utilizado (Diehl y col., 1991). En estudios realizados sobre el contenido de niacina en alimentos irradiados no se observaron pérdidas en chuletas de cerdo tratadas con 5 kGy a diferentes temperaturas. Cuando el tratamiento se aplicó a 0 °C, se produjo una disminución del 15% en los niveles de esta vitamina (Fox y col., 1989). Respecto al ácido pantoténico, se ve poco afectado incluso a dosis superiores a 10 kGy (Thayer y col., 1991). De forma resumida, puede indicarse el orden general de sensibilidad como sigue: tiamina > vitamina C > piridoxina > riboflavina > folatos > cobalamina > ácido nicotínico (WHO, 1994).

Las vitaminas liposolubles presentan igualmente sensibilidades muy variables a las radiaciones ionizantes, siendo la vitamina E la más sensible, especialmente cuando el alimento se irradia en presencia de oxígeno o en el producto congelado (EFSA, 2011b). La vitamina K es la más resistente. Se ha ofrecido una escala decreciente acerca de la sensibilidad de estas vitaminas, tal es: vitamin E > β -caroteno > vitamin A > vitamin D > vitamin K (Diehl, 1995). En un estudio realizado en filetes de dorada negra (*Acanthopagrus australis*) y gallineta nórdica (*Centroberyx affinis*) tratados con rayos gamma a dosis de 1, 2 y 6 kGy, se observó una disminución en el contenido de vitamina E, aunque no se encontró relación con la dosis aplicada. Sin embargo, la cantidad de esta vitamina siempre estuvo por encima de los niveles recomendados para el hombre (Armstrong y col., 1994).

En opinión de la EFSA (2011b) las pérdidas causadas por la irradiación son similares a las descritas en alimentos procesados por otras tecnologías, especialmente los tratamientos térmicos pasteurizantes y esterilizantes, y en su publicación recoge una tabla procedente de la OMS (WHO, 1999) en la que figuran las pérdidas de vitaminas en carne de pollo irradiada con rayos gamma y electrones acelerados a una temperatura de 25 °C con dosis de 59 kGy, se compara con carne esterilizada térmicamente y un lote de carne congelada se utiliza como control. En general, los cambios en los tratamientos esterilizantes y con radiaciones fueron similares. Conviene apuntar que los valores tabulados por la OMS corresponden a datos de tratamientos con radiaciones ionizantes a dosis tremendamente elevadas (59 kGy), valor muy alejado de los 10 kGy permitidos por las regulaciones. En algunos casos se determinaron en las muestras irradiadas cantidades ligeramente mayores a los controles en algunas vitaminas (de forma estadísticamente

significativa, la riboflavina y el ácido fólico). En el informe no figuran el ácido ascórbico ni la vitamina E. La tiamina fue la que presentó las mayores pérdidas: un 16 % en las muestras esterilizadas térmicamente, un 32% en las tratadas con radiación gamma y un 34% en las que se aplicaron electrones acelerados. En el resto de las hidrosolubles apenas hubo pérdidas, siendo la piridoxina y el ácido nicotínico las únicas que merecen la pena mencionar con porcentajes de un 8%, 26%, y 0% para la primera y un 2%, 7% y 0% para el ácido nicotínico. Entre las liposolubles, la pérdida más notable fue del 16% de vitamina D mediante las tres tecnologías. Otros trabajos ofrecen valores que difieren de los precedentes y ofrecen pérdidas en productos vegetales para el ácido ascórbico entre 10 y el 34%.

1.14.5 Otros componentes e ingredientes

Sales inorgánicas

Los aniones inorgánicos apenas reaccionan con los radicales primarios, salvo en el caso de los nitratos que, en presencia de electrones solvatados, se transforman en nitritos. La irradiación gamma parece favorecer la capacidad del ácido ascórbico de reducir los nitritos y, de esta manera, minimizar la formación de N-nitrosaminas, como se ha observado en salchichas tratadas a dosis superiores a los 5 kGy (Ahn y col., 2004).

Anti-nutrientes

Se han llevado a cabo estudios para conocer los efectos de la irradiación, normalmente a dosis superiores a las autorizadas, sobre otros componentes, como los denominados anti-nutrientes. Por ejemplo, se reduce en un 41,8% la actividad del inhibidor de la tripsina en tratamientos con 5 kGy, pasando a ser del 72,5% si la dosis aplicada es de 60 kGy (El-Niely, 2007). Otros autores han descrito reducciones relevantes, de hasta el 10%, de fitatos y taninos en leguminosas irradiadas con dosis de 6 kGy (Brigide y Canniatti-Brazaca, 2006).

Aditivos

Algunos aditivos pudieran verse afectados por la irradiación y, potencialmente, contribuir a la aparición de productos radiolíticos perjudiciales para la salud. A modo de ejemplo puede citarse el estudio desarrollado en muestras de jamón de pavo irradiado en el que se utilizó

benzoato potásico como conservante y luego se detectó benceno en el material irradiado, lo que se explicó como una descarboxilación del benzoato (Zhu y col., 2005a).

1.14.6 Repercusión en el valor nutritivo

La FDA (2012) ha revisado las posibles pérdidas nutricionales de la carne irradiada basándose en que los macronutrientes (proteínas, grasas y carbohidratos) y minerales (calcio, hierro, fósforo, etc.) de la dieta no se alteran significativamente por la irradiación a las dosis permitidas (Diehl y col., 1991; FAO/IAEA/WHO, 1991; Steele y Engel, 1992), y aunque ciertas vitaminas, como la tiamina, pueden sufrir reducciones, la FDA concluye que no existe un efecto adverso sobre el aspecto nutricional por el uso de la radiación ionizante en carne no-refrigerada a dosis máxima de radiación ionizante de 4,5 kGy. Asimismo, el grupo conjunto FAO/OMS/IAEA, sobre irradiación a dosis elevadas, superiores a 10 kGy (OMS, 1999) concluye que los efectos en micro y macronutrientes de los alimentos irradiados son equivalentes, e incluso tienen una mejor calidad nutricional post-tratamiento, que los esterilizados térmicamente. A similares conclusiones llega la AESAN (ACOSAN, 2013) en el caso de la carne: *“No parece existir un efecto adverso de la radiación ionizante sobre las características nutricionales de la carne no refrigerada, a dosis máximas de 4,5 kGy. En dosis superiores a 10 kGy tampoco parece haber cambios nutricionales, en comparación con alimentos esterilizados por calor”*.

1.15 CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS PRODUCTOS IRRADIADOS

La calidad sensorial es, entre las propiedades de los productos alimentarios, un aspecto de gran transcendencia, ya que determina la inclinación del consumidor hacia la elección de un alimento entre la gran diversidad existente en el mercado. Por tanto, aunque no esté relacionada directamente con la seguridad alimentaria, es necesario tener siempre presente los efectos de cualquier tratamiento tecnológico en los atributos que definen la calidad sensorial. En las siguientes líneas se hace un resumen al respecto relativo a los alimentos irradiados.

Los estudios realizados en carne de cerdo, pavo y ternera demuestran que la irradiación provoca la generación de sustancias volátiles que pueden afectar al aroma característico del producto derivado de la acumulación excesiva de hidrocarburos y sustancias azufradas, sobre todo estas últimas, destacando entre ellas el metil mercaptano y el sulfuro de hidrógeno (Stewart, 2010). Por otra parte, la aceleración de los fenómenos

oxidativos que afectan a la Mb y lípidos pueden ocasionar cambios en el color, sabor y aroma de la carne fresca y derivados (Lee y Ahn, 2005; Stewart, 2010; Yang y col., 2011; Ahn y col., 2013). El olor que despiden la carne irradiada es muy característico y se han acuñado diversos términos para describirlo; entre ellos “olor a perro mojado”, “olor dulzón”, “metálico”, “a pluma quemada” o “a medio de cultivo caliente” (Urbain, 1986a; Farkas, 2006; Cabeza y col., 2007; Kwon y col., 2008; Brewer, 2009). Los componentes de la carne principalmente implicados en la producción de estos olores anómalos parecen ser los lípidos (Moy, 2005; Stewart, 2010), aunque también se ha informado que pueden proceder de aminoácidos azufrados, cuya degradación radiolítica origina volátiles de olor acusado y astringente de una mayor intensidad que la de las sustancias volátiles derivadas de los lípidos (Lee y Ahn, 2003). La cantidad de sustancias volátiles que se generan al irradiar la carne depende de la dosis aplicada, lo que determina la intensidad del olor percibido, pero es necesario que se alcance un cierto valor crítico para que pueda ser detectado por el olfato. Por ejemplo, la concentración de sustancias volátiles en pastelitos de carne de cerdo tratados con electrones acelerados a dosis de 4,5 kGy era mayor que en el producto no tratado (Ahn y col., 1998), pero en muestras almacenadas durante 7 días a 4 °C, no se observaron diferencias significativas en el olor y sabor entre las muestras tratadas y no tratadas (Giroux y col., 2001). Cuando el tratamiento de irradiación se aplica en carne de cerdo y vacuno a temperaturas entre 5 y 10 °C, el olor a irradiación se desarrolla a dosis relativamente bajas. Sin embargo, cuando la temperatura durante el tratamiento se mantiene por debajo de 0 °C, la intensidad del flavor desarrollado se reduce considerablemente (Urbain, 1986a).

La irradiación de alimentos, al reducir la carga de microorganismos alterantes, origina también un aumento de la vida útil del producto (Urbain, 1986b; Cabeza y col., 2007), pero es necesario controlar cuidadosamente la dosis aplicada, sobre todo en los productos más sensibles a la radiación, como puede ser el pescado. Otros estudios (Paradis y Adambounou, 1996) han mostrado que el olor de la trucha fluvial (*Fontinalis salvelinius*) resultó afectado de forma desfavorable por la irradiación, siendo más negativo a medida que se aumentaba la dosis del tratamiento. Sin embargo, no se encontraron cambios en el color de dicho producto.

Parte de los efectos mencionados puede contrarrestarse con un envasado adecuado (Nam y col., 2001; Nam y Ahn, 2003a; Moy, 2005; Brewer, 2009), irradiando en estado

congelado (Nam y col., 2002), haciendo uso de antioxidantes o enmascarando los efectos al tiempo que se aportan antioxidantes mediante la incorporación de especias (Lee y Ahn, 2005; Nam y col., 2006; Ahn y col., 2013). Sin embargo, estas medidas no siempre pueden evitar los defectos sensoriales procedentes del acúmulo de volátiles azufrados porque, aunque se encuentren en muy pequeña cantidad, presentan un umbral de detección muy bajo (EFSA, 2011b).

Puede inquietar que la irradiación convierta un alimento alterado en apto para su consumo al minimizarse los signos característicos de la alteración, pero esto es una expectativa infundada. En el informe de la AESAN sobre la aplicación de las radiaciones ionizantes para la higienización de la carne, los preparados cárnicos y los productos cárnicos (AESAN, 2013), se dice textualmente “El SCF (2003) de la comisión europea indicó que *la preocupación sobre el uso abusivo de la irradiación para higienizar alimentos alterados contaminados a unos niveles inaceptables no tiene una base real, ya que la irradiación no restaura la apariencia y las características organolépticas del alimento alterado*”.

Ante, por una parte, la gran variabilidad existente en la radiorresistencia de las bacterias patógenas y, por otra, los posibles efectos negativos en la calidad sensorial y nutricional de los alimentos, resulta imprescindible optimizar el tratamiento que se aplique en cada caso, es decir, se requiere llegar a un compromiso entre la dosis mínima necesaria para lograr el objetivo de seguridad alimentaria y la máxima retención de las propiedades del producto original. No obstante, los cambios en la textura y en las propiedades sensoriales en los alimentos irradiados con dosis inferiores a 2 kGy son mínimos, al menos en productos cárnicos, y repetidas veces se ha informado que es difícil que sean detectados por el consumidor (Singh, 1988; Murano y col., 1995) y, en todo caso, pueden considerarse similares a los ocasionados por otros tratamientos, como el térmico (Urbain, 1986b).

1.16 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS

En los últimos tiempos y, especialmente en las sociedades opulentas, los consumidores se han vuelto muy exigentes; demandan disponer de una gran variedad de alimentos de características nutricionales y sensoriales óptimas, más naturales (libres de aditivos y conservantes), mínimamente procesados, frescos, saludables, seguros desde el punto de vista microbiológico y de conservación prolongada. Estas exigencias han suscitado gran

interés por distintas tecnologías no térmicas que se conocen globalmente como “tecnologías emergentes”. Entre ellas, el MAP, las altas presiones hidrostáticas (APH), los pulsos de luz y pulsos eléctricos, termoultrasonificación y manotermosonificación, etc., son las de mayor interés en la actualidad por las posibilidades que ofrecen como herramientas para el procesado y conservación de los alimentos “en frío” y también para el desarrollo de productos innovadores. Algunas se están aplicando en la práctica, como las MAP y APH, pero las otras están aún en estudio en distinto estado de escalado. La irradiación es también un proceso no térmico, pero no puede encuadrarse dentro de las tecnologías emergentes porque se conoce muy bien y son muy numerosos los estudios que se vienen realizando desde hace algo más de medio siglo.

Sin embargo, su aplicación industrial no está muy extendida, quizás, por una parte, como resultado de que la sociedad la asocia a la contaminación nuclear, lo que es una equivocación y, por otra, por una falta de información a los consumidores de los beneficios potenciales de esta tecnología. El resultado es que la irradiación de alimentos se ha venido considerando como una tecnología de último recurso y ha quedado relegada a ser aplicada cuando todas las demás fallaban y se tenía que recurrir a las radiaciones ionizantes para superar el problema. El caso más emblemático quizás sea el de las hierbas aromáticas y especias, cuya descontaminación no era posible mediante las tecnologías convencionales y antes de la década de 1980 se recurrió al óxido de etileno para su descontaminación pero, al prohibirse el uso de ese agente bactericida (Directiva 86/355/EEC), la única opción que quedaba era la irradiación. De hecho, estos productos son los únicos que pueden irradiarse en cualquier país miembro (Directiva 1999/2/CE). Sin embargo, las consideraciones anteriores están impulsando el uso de la irradiación de alimentos aunque será muy difícil que desbanquen a los tratamientos térmicos convencionales.

Los nuevos estilos de vida han potenciado enormemente la elaboración de alimentos RTE, pero su preparación también ha creado nuevos problemas. Desde el punto de vista de la seguridad microbiológica, el más destacado es la posible contaminación durante diversas operaciones necesarias para la preparación de estos alimentos, como troceado, loncheado, envasado, etc. Como, por una parte, después de estas operaciones el alimento no se somete a ningún tratamiento bactericida y, por otra, no se pueden aplicar las tecnologías convencionales para higienizar (conseguir el FSO) el alimento, no es posible asegurar que estén libres de patógenos. Como resultado de ello, es necesario recurrir a otras tecnologías

y, de las disponibles en la actualidad, sólo dos son las que se pueden utilizar: altas presiones hidrostáticas e irradiación de alimentos. He aquí un ejemplo de la utilidad de la irradiación.

A pesar de los problemas con que se enfrenta la aplicación de radiaciones ionizantes, su uso comporta una serie de ventajas en comparación con las tecnologías convencionales (Calderón, 2000). Resumidamente:

- Evita o reduce el uso de sustancias químicas tóxicas para el hombre y el medio ambiente, como fumigantes, algunos conservantes e inhibidores de la aparición de brotes en hortalizas.
- Frente al uso de fumigantes, presenta mayor penetración, permite un tratamiento más rápido y no requiere la disipación de residuos.
- Puede aplicarse a alimentos en diversos estados (frescos, congelados, líquidos, sólidos, emulsionados, envasados, etc.).
- Aumenta la calidad sanitaria de los alimentos al reducir la carga de microorganismos patógenos hasta niveles seguros a dosis relativamente bajas, del orden de un 60 - 70 % inferior a la máxima de 10 kGy autorizada por las regulaciones.

En la publicación de Narvaiz (2006) se recogen los beneficios de la irradiación de alimentos que se muestran a continuación:

- No produce residuos tóxicos en los alimentos, ni induce radioactividad en ellos.
- El tratamiento no produce más que un ligero aumento de la temperatura, por lo que el producto mantiene las características de “fresco” tras su aplicación (la energía absorbida por el alimento cuando se expone a una dosis de 10 kGy es equivalente a la energía necesaria para aumentar 2,4 °C la temperatura del agua. Esta peculiaridad permite tratar alimentos congelados sin que se produzca cambio de estado de los mismos.
- Incrementa la vida útil de los alimentos, lo que permite por un lado el mantenimiento de las propiedades del producto fresco durante más tiempo y, por otro, la exportación a lugares más lejanos del producto tratado.
- Debido a su capacidad de penetración (de 5 a 8 cm, en el caso de los electrones acelerados), es posible tratar el alimento dentro de su envase final, e incluso en envases de distintos tipos de plásticos (poliestireno, polietileno, PVC, etc.), papel

o cartón. De esta forma, se evitan las contaminaciones que aparecen cuando se tratan a granel y luego se envasan para su posterior distribución, transporte y venta.

- De la premisa anterior deriva que la irradiación resulte idónea para el tratamiento de raciones individuales o familiares. Además, permite alcanzar lugares recónditos a los que no tienen acceso otros tratamientos superficiales como las radiaciones ultravioleta o los lavados con ácidos orgánicos (Ohlsson y col., 2002).
- Se puede monitorizar mediante dosímetros que permiten conocer la intensidad del tratamiento aplicado.

En el libro de Rahman (2002) puede leerse otra serie de ventajas:

- Evita pérdidas de alimentos durante el almacenamiento post-recolección de ciertos productos cuya colonización por insectos es muy común.
- Muchos alimentos no pueden ingresar en el comercio internacional por invasión por insectos, contaminación por microorganismos o tener una vida útil corta. La irradiación permite mejorar estos problemas.
- La irradiación permite ahorrar energía; según este autor, el gasto es menor que en el enlatado o el almacenamiento bajo congelación, e igual que el de la refrigeración. Los datos que se ofrecen se ejemplarizan con el gasto para procesar y almacenar una canal de pollo con distintos tratamientos: 46.600 kJ/kg para su congelación, 20.180 kJ/kg para el enlatado y sólo 17.760 kJ/kg para su refrigeración en crudo y 17.860 kJ/kg en el caso del tratamiento de irradiación.

Por otra parte, la irradiación también tiene desventajas. En comparación con los tratamientos térmicos, las más destacadas son:

- La aplicación a muchos productos requiere autorización por los organismos competentes.
- Es una tecnología que no es bien acogida por parte de la sociedad.
- Los virus son muy radiorresistentes, precisando dosis superiores a 10 kGy para conseguir unas pocas reducciones decimales.
- Las enzimas no se inactivan totalmente mediante las dosis permitidas.
- Aunque la irradiación de alimentos puede también utilizarse para su esterilización, su eficacia no es ni siquiera próxima a la de la esterilización térmica, ya que se

necesitan dosis de radiación muy elevadas para conseguirla. En consecuencia, no se vislumbra que pueda desplazar a la esterilización térmica.

1.17. DETECCIÓN DE ALIMENTOS IRRADIADOS

Dado el control y restricciones a que están sometidos los alimentos irradiados, se requiere métodos que puedan detectar si un determinado alimento que se ha distribuido en el mercado ha sido, o no, sometido a irradiación. La detección de alimentos irradiados es un proceso crítico para facilitar el comercio internacional de estos productos, monitorización de la trazabilidad y aumentar la confianza de los consumidores. Es, por tanto, de interés para las agencias gubernamentales, industrias alimentarias y consumidores. Un método ideal debe reflejar fielmente el efecto específico de la radiación que es proporcional a la dosis aplicada y no debe verse afectado por las condiciones de almacenamiento o el tiempo transcurrido entre el tratamiento y el momento del análisis. Los métodos desarrollados se basan principalmente en la detección de sustancias radiolíticas generadas principalmente del material lipídico, modificación de ciertos componentes de los alimentos (p. ej., aminoácidos, carbohidratos o ADN), generación de radicales libres y modificaciones de la microbiota.

Se han desarrollado métodos físicos, químicos y microbiológicos con tal fin, cuya eficacia ha sido comprobada mediante estudios inter-laboratorios y, como resultado, los diversos países y laboratorios privados los han adaptado para el control de productos e ingredientes irradiados. A modo de ejemplo, a continuación se ofrece una selección de diversos métodos de referencia en la Unión Europea:

EN1784:2003: Análisis de hidrocarburos mediante cromatografía de gases para alimentos que contengan grasa, validado con carne fresca, queso camembert, papaya, mango y aguacate.

EN1785:2003: Análisis de 2-ACB mediante cromatografía de gases-masas para alimentos que contengan grasa. Validado con carne fresca de ave, cerdo, salmón, queso camembert y huevo líquido.

EN1786:1996: Análisis mediante resonancia de espín electrónico (determina radicales libres) para alimentos que contengan hueso, validado con hueso de vacuno y de ave y espinas de trucha.

EN1787:2000: Análisis mediante resonancia de espín electrónico para alimentos que contengan celulosa, validado con pistacho, pimentón y fresas frescas.

EN13708:2001: Análisis mediante resonancia de espín electrónico para alimentos que contengan azúcar cristalizado, validado con papaya, uvas, higos y mango deshidratados.

EN13783:2001: Detección (exploración) de hierbas y especias irradiadas mediante análisis de epifluorescencia directa/recuento de aerobios.

EN13751:2002: Detección de alimentos irradiados mediante luminiscencia fotoestimulada (detecta la presencia de moléculas excitadas que emiten luz) para detectar partículas minerales (p. ej. silicatos), validado con marisco, hierbas, especias y condimentos.

Se remite al lector a la lista completa que figura en un documento de la EFSA (2011b).

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Una de las vertientes del diseño de la política de investigación en España por el antiguo Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) fue la creación del programa CONSOLIDER-INGENIO-2010, y un grupo de investigadores con una amplia actividad investigadora acudieron a la convocatoria de dicho programa con el objetivo de acometer investigaciones con la finalidad de auxiliar, asistir e impulsar la industria cárnica española. Para ello, tras identificar las temáticas que reclamaban solución en el sector cárnico, perfilaron un proyecto de investigación que se denominó “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” de acrónimo CARNISENUSA que se estructuró en cuatro subproyectos. El proyecto fue aprobado en la convocatoria de 2007. Uno de los subproyectos, de acrónimo PROCARTE (Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de productos cárnicos listos para su consumo -RTE-), tenía como objetivo investigar algún procedimiento para higienizar (consecución del objetivo de seguridad alimentaria, FSO) productos cárnicos RTE dado que en estos alimentos, ya envasados, no es posible aplicar tecnologías convencionales para su higienización y es necesario recurrir a otras estrategias tecnológicas. Urgía poner a punto un método para reducir el número de microorganismos patógenos hasta niveles seguros. Aparte del estudio de otras tecnologías físicas (altas presiones y pulsos de luz) y algunos bioconservantes (bacteriocinas, lactoferrina y derivados), se planificó una investigación para indagar si era posible eliminar los microorganismos patógenos de mayor relevancia de los productos cárnicos RTE mediante la aplicación de electrones acelerados.

Desde el siglo pasado se sabe que la cinética de muerte por la radiación se ajusta a una reacción de primer orden, cuyos valores de reducción decimal (valor D) para muchas bacterias, tanto patógenas como alterantes, han quedado plasmados en publicaciones anteriores al año 1980. Entre las primeras, *Staphylococcus aureus* (Erdman y col., 1961), diversos serovares de *Salmonella* (Quinn y col., 1967), *Yersinia enterocolitica* (El-Zawahry y Rowley, 1979), *Clostridium botulinum* (Anellis y Koch, 1962) y entre las alterantes, *Bacillus coagulans* (Anellis y col., 1960), *Acinetobacter* spp. (Maxcy y col., 1976) y *Pseudomonas* sp. (Maxcy y Tawari, 1973). Los diferentes estudios científicos realizados en esas fechas cristalizaron, en 1980, en un informe de un comité conjunto de la FAO/OIEA/OMS (WHO, 1981), que establecieron como segura una dosis máxima de 10 kGy en cualquier producto alimenticio, lo que motivó a la Comisión del Codex Alimentarius a adoptar en 1983 (CODEX STAN 106-1983) una norma general a nivel mundial para alimentos irradiados.

Dos bacterias patógenas (*L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7) de gran importancia por su severa patogenicidad, emergieron con posterioridad a la publicación del documento de la FAO/OIEA/OMS. Aunque *L. monocytogenes* se conocía desde 1926, no fue hasta 1981 cuando emergió como patógeno alimentario en un brote producido en EEUU por el consumo de ensalada de repollo (Schlech y col., 1983) y un par de años más tarde se produjo en California un brote muy grave (142 afectados con 48 muertes) de listeriosis debido al consumo de queso de estilo mejicano fabricado con leche infrapasteurizada (Linnan y col., 1988). Debido a ello, se determinó tanto la termorresistencia (Bradshaw y col., 1987) como la radiorresistencia (Huhtanen y col., 1989) de dicho microorganismo. *E. coli* O157:H7 tiene un historial muy similar al de *L. monocytogenes* dado que se identificó como patógeno alimentario en 1982 a raíz de un brote gastrointestinal producido por el consumo de hamburguesas (Riley y col., 1983). Años después se estudió su radiorresistencia en matrices cárnicas (Clavero y col., 1994).

Adicionalmente, cabe apuntar que el procesado por radiaciones ionizantes reduce de manera espectacular las poblaciones de la microbiota autóctona de los alimentos, ya que, en su mayoría, está compuesta por bacterias Gram negativas que son muy sensibles a la radiación (Monk y col., 1995). Entre ellas, destacan las del género *Pseudomonas* por ser las bacterias que con mayor frecuencia ocasionan la alteración de la carne fresca refrigerada. Para ellas, se han descrito valores D de 0,13 kGy en carne magra de vacuno (Maxcy y Tawari, 1973).

Puede decirse, en conclusión, que la comunidad científica considera la irradiación de alimentos como segura y así lo han avalado organismos institucionales (FAO/IAEA/WHO, 1981; WHO, 1994; FDA, 1999; AESA, 2005b; EFSA, 2011a, 2011b; AESAN, 2013) y que, además de contribuir a aumentar la protección del consumidor destruyendo microorganismos patógenos en los alimentos, es un procedimiento efectivo para ampliar la vida útil de los alimentos.

La irradiación de alimentos ha sido una "tecnología de último recurso durante décadas" y sólo se utilizaba cuando todo lo demás fallaba. Quizás por eso, en la Unión Europea (EU), la única lista de alimentos o ingredientes alimentarios autorizados para el tratamiento con radiación ionizante es la aprobada por la Directiva 1999/3/CE: "hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales", para los que se establece un valor máximo de dosis total media de radiación absorbida de 10 kGy. La lista no es cerrada, ya

que la norma prevé un procedimiento de solicitud para la inclusión de nuevos productos alimenticios y permite que los estados miembros de la UE autoricen otros productos. De hecho, por ejemplo, Francia, Holanda, Bélgica, Italia o el Reino Unido, han autorizado irradiar toda una serie de alimentos o ingredientes alimentarios que van más allá de los comprendidos en la lista aprobada por la Directiva Europea. Entre ellos, se incluyen cebolla, ajo, hortalizas secas y frutos secos, copos y gérmenes de cereales para productos lácteos, harina de arroz, goma arábiga, aves de corral, carne de pollo recuperada mecánicamente, menudillos de pollo, ancas de rana congeladas, clara de huevo, caseína y caseinatos, así como gambas congeladas, peladas o bien descabezadas. En España se tratan solamente especias (fundamentalmente pimentón) de acuerdo con la Directiva 1999/3/CE.

Conforme a la legislación comunitaria, la irradiación de productos alimenticios sólo podrá autorizarse cuando:

- esté justificada y sea necesaria desde el punto de vista tecnológico,
- no presente peligro para la salud y se lleve a cabo de acuerdo con las condiciones propuestas,
- sea beneficiosa para el consumidor, y
- no se utilice como sustituto de medidas de higiene y medidas sanitarias ni de procedimientos de fabricación o agrícolas correctos.

Otros países tienen sus propias regulaciones. Por ejemplo, en EEUU el organismo competente de las autorizaciones es la *Food and Drug Administration* (FDA). En la actualización de 30 de Enero de 2013 de la regulación relativa a alimentos que pueden someterse a irradiación (21 CFR 179.26) figura la lista de los que pueden someterse al tratamiento con radiaciones ionizantes y en último lugar, el decimotercero, puede leerse: “13. Use: For control of foodborne pathogens, and extension of shelf-life, in unrefrigerated (as well as refrigerated) uncooked meat, meat byproducts, and certain meat food products. Limitations: Not to exceed 4.5 kGy”

Con la financiación del proyecto CARNISENUSA y dentro del subproyecto PROCARTE, se han llevado a cabo estudios (de la Hoz y col., 2011; Ordóñez, 2013) acerca de la higienización de diversos alimentos mediante la aplicación de electrones acelerados. Entre ellos, jamón cocido y mortadela, como ejemplo de productos nitrificados con una actividad de agua (a_w) mayor de 0,92 (puede crecer *L. monocytogenes*); jamón

serrano, embutidos madurados (salchichón y chorizo) y cecina, los tres productos con una a_w inferior a 0,92 (no puede multiplicarse *L. monocytogenes*); carne fresca de pollo, lomo fresco y adobado de cerdo, hamburguesas y carpaccio, todos ellos con a_w superior a 0,92, salmón ($a_w > 0,92$) y atún ($a_w < 0,92$) ahumados. Se han optimizado los tratamientos para todos los productos mencionados (Cabeza y col., 2011; Cambero y col., 2012) y se han modelizado algunos de ellos (Benedito y col., 2011; Cárcel y col., 2014).

El plan de trabajo propuesto y aprobado por el MEC en 2007 establecía, entre otras cosas, que se celebraría una reunión plenaria anual para verificar los resultados de las investigaciones realizadas y programar los estudios del próximo periodo. En la reunión que tuvo lugar en la Universidad de Pamplona en los días 7 y 8 de Septiembre de 2009, el representante de una de las industrias participantes en CARNISENUSA propuso una investigación que, en principio, no estaba programada. La pregunta que hizo en el pleno de la asamblea era muy transparente “¿Es posible aumentar la vida útil de lomo de cerdo fresco y adobado mediante la aplicación de un tratamiento con electrones acelerados?”. Subyacía un asunto de gran importancia, derivado del comercio internacional de carne fresca a grandes distancias (desde España a países miembros de la UE y a terceros países, incluidos los asiáticos, como Corea o Japón), donde, debido al carácter perecedero de la carne, se requiere el transporte en estado congelado porque, de lo contrario, en refrigeración, el producto no puede llegar en condiciones de comercializarse ya que se detectarían signos de alteración o, realmente, llegaría ya alterado. Téngase en cuenta que la vida útil de la carne refrigerada no es de más allá de una semana (Nottingham, 1982; Dainty y col., 1983; Siegel, 2001). Sin embargo, la entidad receptora constantemente reitera y solicita un envío del producto en estado refrigerado por tener una mayor calidad sensorial y microbiológica. De lo contrario, si no se accede a ese requerimiento puede que indaguen otras fuentes para el suministro del producto.

Bajo los principios con que se diseñó el proyecto CARNISENUSA, es decir, “auxiliar, asistir e impulsar la industria cárnica española”, se atendió a la propuesta de la industria. Los resultados de las investigaciones que se realizaron se recogen en la presente memoria, cuyos **objetivos principales** fueron:

1. Estudiar la posibilidad de aplicar electrones acelerados para ampliar la vida útil de lomo de cerdo fresco y adobado mantenidos bajo refrigeración.

2. Indagar si el tratamiento aplicado es adecuado para higienizar el producto respecto, principalmente, a *L. monocytogenes*, debido a su carácter psicrotrofo. Pudiera ocurrir que al ampliar la vida útil del producto y eliminar la competencia microbiana fuese un microorganismo dominante en el producto tratado. La relevancia de este objetivo tendría su interés desde dos puntos de vistas. Uno, del de salud pública en tanto en cuanto las contaminaciones cruzadas en industrias, almacenes frigoríficos y obradores de supermercados podrán contaminar a otros alimentos y, el segundo, del lado comercial dada la facilidad de detectar *L. monocytogenes* mediante enriquecimientos lo que, independientemente de su peligrosidad, que podría incluso ser prácticamente nula si la carga estuviese muy por debajo de la dosis infectiva, conllevaría la retirada de la mercancía del comercio en aquellos países con el criterio de “tolerancia cero”.
3. Estudiar el efecto del tratamiento con electrones acelerados en la textura, color y características sensoriales del producto y, en conjunto, determinar su aceptación por el consumidor
4. Determinar el efecto del tratamiento con electrones acelerados en la fracción lipídica más radiosensible: fosfolípidos y óxidos de colesterol.
5. Analizar el efecto del tratamiento con electrones acelerados en los componentes volátiles.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

El material de vidrio empleado en las experiencias que se describen en esta tesis, de tipo “Pirex”, se adquirió en diversas casas comerciales. El material de plástico estéril utilizado era de la firma Nunc (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y FalconTM test tubes (Difco, Detroit, Michigan, EEUU).

El agua destilada destinada a la preparación de medios de cultivo y disoluciones acuosas se obtuvo en un destilador Millipore Elix 3, que funciona por ósmosis inversa y proporciona una calidad de agua con una resistividad del orden de 15 MΩ. El agua necesaria para preparar las disoluciones, muestras y patrones utilizados en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue agua MiliQ, de calidad superior (18MΩ), obtenida en un dispositivo acoplado al anterior.

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato “AND” mod. EK- 1200A, mod. FX-320 y mod. GF-2000, y las de precisión en balanza analítica Sartorius mod. 2443 (Goettingen, Germany).

La homogenización de las muestras para los análisis químicos se realizó en un homogenizador Polytron mod. PT 10-35 (VWR, Pensilvania, EEUU), y la de las destinadas a los análisis microbiológicos en un *Stomacher* o masticador (IULinstruments, Barcelona, España).

Las disoluciones y medios de cultivo se prepararon en agitadores magnéticos “Selecta” mod. Agimatic N y “Thermolyne” mod. Nuova II, (Barcelona, España) dotados ambos de calefacción que se usó cuando fue necesario. También se utilizaron agitadores de tubos “Heidolph” mod. Reax 2000 y 4000 (Schwabach, Germany).

La conservación de microorganismos en congelación (-40 °C) se realizó en arcones “Liebher”, y la de las cepas microbianas y muestras cárnicas refrigeradas en frigoríficos “Sanyo Medicoool”, “Philco”, “Fagor” o “Electrolux”. Cuando se necesitaron almacenar muestras de lomos durante largos periodos, se envasaron a vacío y se conservaron bajo congelación (-24 °C) en armarios/arcones “Liebher”.

La incubación de microorganismos se efectuó en estufas “Heraeus” mod. B-6200 (Hanau, Germany) termostatadas a la temperatura deseada.

La esterilización de los medios de cultivo, de las disoluciones y del material general de laboratorio se llevó a cabo en autoclaves “Selecta” mod. Autoeser G y 43-G a 121 °C durante 16 min. Cuando se necesitó esterilizar a calor seco, se hizo en hornos “Heraeus” durante 2-2,5 h a 180 °C.

Para el recuento de microorganismos, se sembraron las diluciones decimales adecuadas utilizando el procedimiento de siembra en masa. Tras la incubación en las condiciones óptimas para cada microorganismo, se procedió al recuento de los mismos mediante un contador de colonias digital *Colony Counter*, digital SJP (Selecta, Barcelona, España). Se utilizaron placas Petri estériles de polietileno de 8,5 cm de diámetro.

Las pipetas automáticas utilizadas fueron Pipetman[®] P de Gilson, S.A.S. (Villiers le Bel, France) (mod. 20, 200, 1000 y 5000C) que dispensan volúmenes de 2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL y de 1-5 mL, respectivamente.

El mantenimiento de los medios de cultivo fundidos previo a su distribución en las placas Petri se hizo en un baño “Bunsen” (Humanes de Madrid, Madrid, España) mod. BA-12 termostataado a 50 °C.

3.2 LOMO DE CERDO FRESCO Y ADOBADO

Para la realización de las distintas experiencias se utilizaron piezas íntegras de lomo (*longissimus dorsi*) de cerdo, fresco y adobado (con un total aproximado de 7 a 9 de piezas de cada producto) procedentes de canales 24 h *postmortem*, de una industria cárnica local (Industrias Vaquero S.A., Madrid, España). El peso de las piezas fue de 3,5 a 5 kg.

El adobado se realizó en la industria bajo la supervisión de la autora. Para ello, las piezas se sometieron a fricción (“masaje”) mecánica durante 15 min en el interior de un tambor giratorio que contenía una salmuera consistente en cloruro sódico (1,6%), nitratos y nitritos (0,025%), ascorbato sódico (0,080%) y especias (pimienta blanca y pimentón). Las piezas se dejaron sumergidas en dicha salmuera durante 2 días a 2-4 °C y, posteriormente, se transportaron al laboratorio en envases de polietileno en un tiempo inferior a 1 h.

3.3 MICROORGANISMOS

En este trabajo se ha usado la cepa NCTC 11288, CECT 910^T, ATCC 33090 de *Listeria innocua* (ex Seeliger & Schoofs, 1979) Seeliger, 1983 (Seeliger y Jones, 1986),

suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Se utilizó esta especie como sustituta de *L. monocytogenes*, debido a que presenta una mayor resistencia frente a tratamientos de destrucción microbiana, como altas presiones hidrostáticas (Yuste y col., 1999), calor (Murphy y col., 2002) y radiaciones ionizantes (Cabeza y col., 2007), entre otros. De esta forma, se evita el riesgo que supone trabajar con la cepa patógena.

3.3.1 Recuperación de las cepas liofilizadas

Para la revitalización de las cepas, el cultivo liofilizado se resuspendió en caldo tripticaseína soja (TSB). Posteriormente, se procedió a la siembra de unas gotas de la suspensión obtenida en agar tripticaseína soja (TSA) para comprobar la ausencia de contaminación, y el resto de la suspensión se añadió al medio líquido mencionado anteriormente. Por último, se incubaron en las condiciones óptimas de crecimiento (37 °C durante 24 h) para *L. innocua*. Las cepas se mantuvieron en congelación (-40 °C) en caldo TSB con un 10% de glicerol como agente criogénico.

3.3.2 Revitalización de cultivos

En los experimentos se emplearon siempre cultivos recientes. Para ello, a partir del *stock* en congelación, se inocularon tubos con TSB que se incubaron a 37 °C durante 24 h. A continuación, se realizó un subcultivo en tubos con el mismo medio que se incubaron en las condiciones anteriores. El cultivo obtenido se centrifugó a 4 °C y el sedimento se resuspendió en un vaso de precipitado que contenía 50 mL de solución salina estéril, consiguiéndose de este modo, una suspensión con una carga bacteriana del orden de 10^8 células/mL (Cabeza y col., 2007).

3.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las piezas enteras, tanto de lomo fresco como adobado, se dividieron en alícuotas representativas (de aproximadamente 500 g) que se usaron en los análisis destinados a conocer el efecto del tratamiento con electrones acelerados en la vida útil y en las propiedades físico-químicas (pH, a_w , contenido en humedad, extracto seco, cenizas), textura, color, propiedades sensoriales, contenido en fosfolípidos, óxidos de colesterol y compuestos volátiles del producto.

Únicamente se contaminaron las muestras destinadas al establecimiento de los parámetros de radiorresistencia de *L. innocua*. Con este fin, las piezas de lomo se cortaron

en filetes de aproximadamente 0,5 cm de espesor con una máquina loncheadora (Type ES 300, model DOM. Beckers Italy, Treviglio, Italy) cuyas cuchillas y superficies de contacto fueron previamente limpiadas en profundidad. A continuación, las muestras se introdujeron durante 10 s en la suspensión de células de *L. innocua* anteriormente descrita, lo que proporcionó un número de bacterias del orden de 10^7 - 10^8 ufc/cm². Se empleó un elevado número de microorganismos para poder construir gráficas de supervivencia fidedignas y determinar, a partir de ellas, la cinética de destrucción frente al tratamiento con electrones acelerados.

Posteriormente, se procedió al envasado de todas las muestras en tres atmósferas diferentes: vacío, aire y una atmósfera modificada (MAP) enriquecida con dióxido de carbono. Para ello, se utilizaron envasadoras de la marca VAPTA (Vapta, S.L. Humanes de Madrid, Madrid, España) modelos Euvac (para el envasado a vacío) y TMM 37/28 (para el envasado en MAP). Se utilizaron bolsas de plástico laminado (90 μ m) de baja permeabilidad (60 μ m copolímero de poliamida/polietileno) a los gases (35 cm³/24 h m² bares para el oxígeno y 150 cm³/24 h m² bares para el dióxido de carbono) (Plastiñi, La Rioja, España). En el caso del envasado a vacío se extrajo el aire de las bolsas hasta alcanzar 20 kPa y, en el envasado en MAP (CO₂/O₂/N₂, 30/20/50, v/v/v), la proporción producto/gases fue aproximadamente de 1 (3 filetes)/4 (p/v). La mezcla de gases empleada para este envasado fue preparada, por encargo, por Carburos Metálicos. Las bolsas de las muestras envasadas en aerobiosis, se cerraron con una termoselladora (MeC, Impulse sealer, NO. A 345364), manteniendo la misma relación producto/aire que en el caso de las MAP.

3.5 TRATAMIENTO CON ELECTRONES ACELERADOS

Todas las muestras, una vez preparadas, se enfriaron (<5 °C) y se transportaron en recipientes isotermos de polipropileno expandido a la planta IONISOS IBÉRICA S.A., sita en Tarancón (Cuenca, España), donde se realizó el tratamiento con electrones acelerados (radiación β). Las muestras se sometieron a dosis entre 0,2 y 3 kGy en el equipo de ionización electrónica de dicha planta que opera a 10 MeV con una potencia máxima de 80 kW.

El equipo que se muestra en la figura 3.1 es el que se utilizó en este trabajo; corresponde a un acelerador de electrones Rhodotron TT200 (IBA Industrial, Lovain-La-

Neuve, Belgium). En esta figura se muestra una fotografía del núcleo del acelerador de electrones (a), otra de una sección del mismo donde pueden observarse los electroimanes impulsores (b) y un esquema del mecanismo que explica cómo se lanzan los electrones de un electroimán a otro hasta su salida cargados de energía (c).

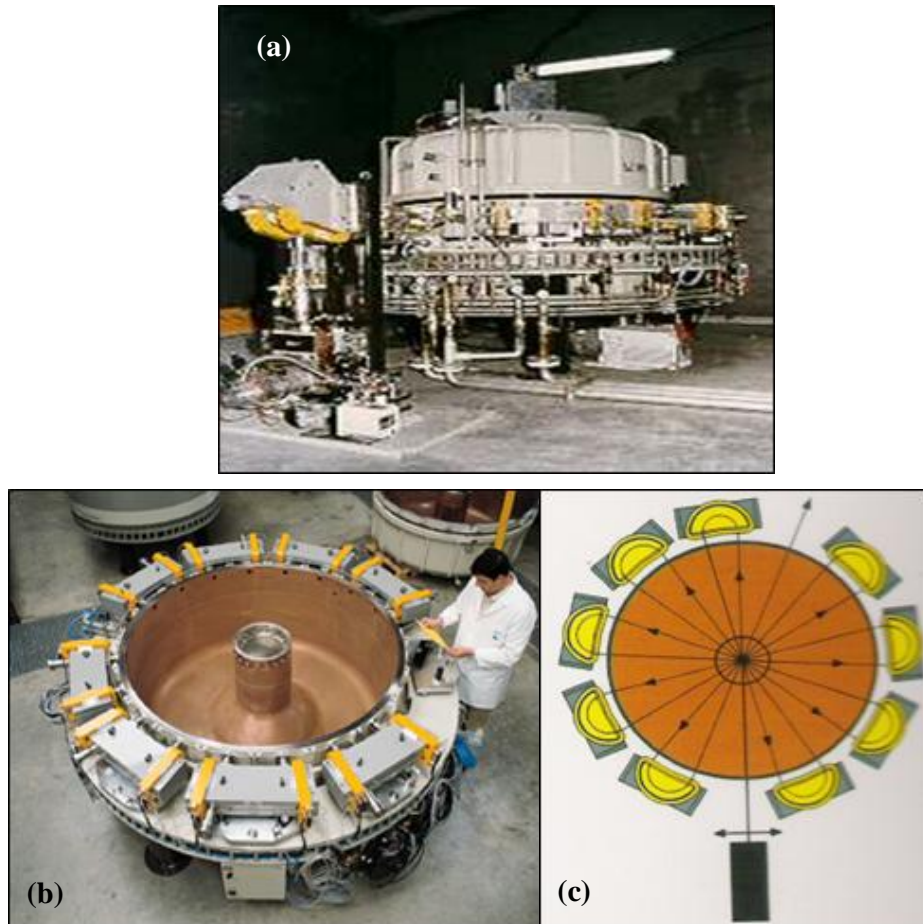


Figura 3.1 Imagen de un acelerador de electrones (véase texto)

El equipo Rhodotron opera bajo el principio básico de que los electrones aumentan su energía cuando atraviesan un campo eléctrico radial paralelo a la dirección del movimiento. La aceleración de electrones tiene lugar en una cámara de vacío al recorrer una trayectoria de varios bucles conformando la proyección de una margarita (*Rhodos*, del griego *flor*) atravesando varias veces el centro de la cámara, lo que permite el funcionamiento del equipo en modo continuo. Los electrones se generan en la fuente de electrones y se lanzan al interior de la cámara donde se acoplan con un campo electromagnético variable con frecuencia de 10^7 MHz, cuyo sentido va cambiando al mismo ritmo en que los electrones atraviesan el centro de la cavidad, obteniéndose a cada paso una ganancia de energía de 1 MeV originada por la tensión de 1 MV existente entre el

centro de la cavidad y las paredes exteriores. Nueve electroimanes deflectores se encargan de lanzar los electrones al punto diametralmente opuesto pasando, de nuevo, por el centro geométrico. Finalmente, los electrones salen de la cámara con una energía de 10 MeV, desviados 90° y dispersados en el cono de barrido, el haz, de una anchura aproximada de 1 m, para incidir en la muestra con una frecuencia de 100 Hz.

En este proceso es fundamental el control de la energía de los electrones, la potencia del haz y la longitud de barrido. Estos factores, junto con la velocidad de paso del producto bajo el haz, determinan la dosis que éste recibe.

La dosis exacta absorbida por el material se comprobó determinando la absorbancia de dosímetros de triacetato de celulosa CTA-125 (Fuji, Japan), que se trataron simultáneamente con las muestras. Se trata de una cinta de película para medidas de dosis en continuo, que bajo la influencia de la radiación cambia sus propiedades de absorción óptica. Evaluando estos cambios a una determinada longitud de onda (280 nm), se puede determinar la dosis absorbida por el producto.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-24 °C) por triplicado. El aumento de temperatura durante el tratamiento fue inferior a 2 °C. Después del tratamiento de ionización, las muestras se transportaron, en los recipientes isoterms citados anteriormente, hasta el laboratorio donde se realizaron los análisis correspondientes al día 0. El resto de muestras se almacenaron a 4 y 8 °C (ésta última como ejemplo de abuso de temperatura durante la distribución del producto) para estudiar su comportamiento en el tiempo.

3.6 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Los estudios microbiológicos realizados en esta tesis se llevaron a cabo de acuerdo al esquema de la figura 3.2

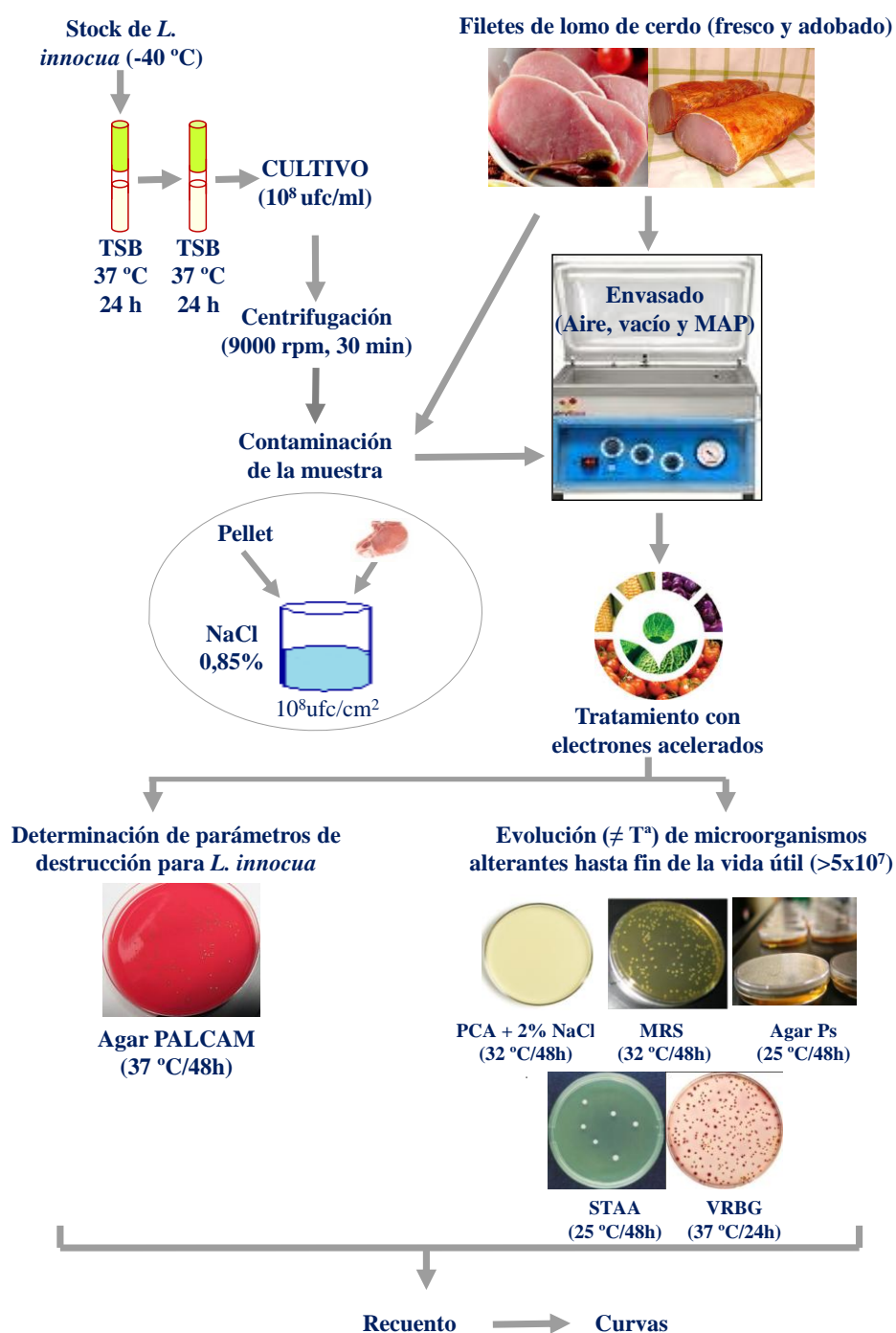


Figura 3.2 Esquema del protocolo seguido para los análisis microbiológicos

3.6.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo y diluyentes utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron suministrados por “Difco”, “Conda-Pronadisa” (Torrejón de Ardoz, Madrid, España) u “Oxoid” (Basingstoke, Hampshire, United Kingdom).

Se emplearon los siguientes medios de cultivo:

- Agar de recuento en placa (Plate Count Agar, PCA) (Difco) + 2% de NaCl (López-Gálvez y col., 1998), para el recuento de microorganismos viables totales.
- Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), suministrado por Conda-Pronadisa, a un pH de 5,6 (López-Gálvez y col., 1998), para el recuento de BAL.
- Agar “rojo violeta, bilis, glucosa” (*violet red, bile, glucose agar*, VRBG) (Oxoid), para la enumeración de enterobacterias.
- Las pseudomonas se determinaron en agar base *Pseudomonas*, suplementado con CFC (cetrimida, fucidina y cefalosporina) (Oxoid).
- Agar STAA (*Streptomycin sulfate cycloheximide thallous acetate agar*) (Oxoid), para el recuento de *Brochothrix thermosphacta*.
- Caldo tripticaseína soja (*Tryptic Soy Broth*, TSB), para la revitalización y el cultivo de cepas de *Listeria* spp.
- Agar Palcam con el suplemento selectivo de polimixina B, hidrocloreuro de acriflavina y caftazidima y emulsión de yema de huevo (Oxoid) para la determinación de las listerias supervivientes al tratamiento ionizante en materiales con microbiota mixta. La emulsión yema de huevo se utilizó para la recuperación de las células dañadas de acuerdo a las recomendaciones del catálogo.

3.6.2 Cinética de destrucción de *Listeria innocua* frente al tratamiento con electrones acelerados

El recuento de supervivientes al tratamiento con electrones acelerados se realizó por el método de dilución en placa. El diluyente elegido fue suero fisiológico al 0,85% esterilizado previamente durante 16 min a 121 °C. Con ayuda de una micropipeta, se tomaron 100 µL de la muestra correspondiente, previamente homogeneizada durante 2 min en el *stomacher* citado en el apartado 3.1, que se transfirieron a un tubo “eppendorf” que contenía 9 volúmenes de suero fisiológico, obteniendo así la dilución 10^{-1} . A partir de esta

dilución se prepararon, siguiendo la misma pauta, las sucesivas diluciones decimales. De acuerdo al número de microorganismos viables esperados, se procedió a la siembra en masa de las diluciones adecuadas en agar Palcam adicionado de antibióticos y emulsión yema de huevo. Una vez realizada la siembra, las placas se incubaron en las condiciones óptimas de crecimiento para listerias (37 °C durante 48 h). Transcurrido este tiempo, se procedió al recuento de microorganismos con el contador de colonias digital mencionado en el apartado 3.1. Teniendo en cuenta la dilución sembrada y el volumen de la misma, se calculó el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por cm² de producto.

La muerte de los microorganismos por los electrones acelerados no sigue un orden fortuito, sino que se destruyen de forma ordenada, ajustándose a una ecuación de primer orden, por lo que la representación, a escala logarítmica, del número de supervivientes en función de la dosis aplicada a escala decimal (gráfica de supervivencia) es una línea recta.

El valor D se calculó matemáticamente a partir de la ecuación de la recta de regresión lineal, donde $D = 1/\text{tg } \alpha$.

3.6.3 Estudio de vida útil del producto y evolución de la microbiota endógena

El recuento de supervivientes y el cálculo de la dosis de reducción decimal para cada uno de los microorganismos (o grupos microbianos) estudiados se realizó siguiendo un procedimiento similar al descrito en el apartado anterior para *L. innocua*.

Las condiciones de la incubación, variaron dependiendo del microorganismo en cuestión:

Aerobios mesófilos totales y BAL (32 °C, 48 h),

Enterobacteriaceae (37 °C, 24 h),

Pseudomonas spp. (25 °C, 48 h), y

Brochothrix thermosphacta (25 °C, 48 h).

Las curvas de crecimiento se construyeron de acuerdo con el modelo de Baranyi y Roberts (1994).

El recuento de microorganismos se realizó inmediatamente después del tratamiento (día 0) y a diferentes tiempos durante el almacenamiento (4 y 8 °C) del producto hasta el final de su vida útil, considerándose como tal cuando el recuento de aerobios mesófilos totales fue superior a 5×10^7 ufc/cm².

3.7 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

3.7.1 Actividad de agua (a_w)

La determinación de la a_w se llevó a cabo en un higrómetro de punto de rocío Decagon CX-1 (Aqualab. Model Serie 3, Decagon Devices Inc. Pullman, Washington, EEUU) a una temperatura de 25 °C utilizando cápsulas de plástico suministradas por el fabricante. Las medidas se realizaron introduciendo en la cubeta del higrómetro la cápsula con unos 2 g de muestra picada en trozos pequeños (<5 mm). Después de 1 ó 2 min, cuando se alcanza el punto de rocío, el aparato proporcionó la lectura de la temperatura y la a_w de cada muestra. Previamente se comprobó la exactitud de las medidas del higrómetro con soluciones salinas saturadas de a_w conocida (Labuza y col., 1976). Las determinaciones se realizaron por triplicado inmediatamente después del tratamiento (día 0) y a los 5 días de almacenamiento a 4 °C.

3.7.2 pH

Para la determinación del pH se homogeneizó 1 g de muestra en 9 mL de agua destilada durante 1 min. El pH de la dilución resultante se midió a temperatura ambiente con un pH-metro Digit-501 (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España), controlando la temperatura y calibrándolo previamente con dos tampones de referencia (pH 7,0 y 4,0), de la misma firma. Las medidas se efectuaron por triplicado en los días 0 y 5 después del tratamiento con electrones acelerados.

3.7.3 Humedad y cenizas

El contenido de humedad se determinó según el método 950.46 B de la AOAC (1995). Las cápsulas de porcelana utilizadas para las pesadas fueron suministradas por Vidrio Industrial Pobel S.A. (Pol. Ind. Vallecas, Madrid, España). La humedad ambiental de las cápsulas se eliminó mediante calentamiento en una estufa Herausmod. KFTU-K (Heraus S.A., Boadilla, Madrid, España) a 110 °C durante 2 h y, después, se dejaron enfriar en un desecador a vacío de vidrio con gel de sílice activado. A continuación, se pesaron las cápsulas vacías (*CP*). Muestras de aproximadamente 2 gramos de peso previamente trituradas en una picadora eléctrica Moulinex D.65. (SebIberica, S.A., Barcelona, España) se depositaron en dichas cápsulas y se procedió a su pesada (peso de la cápsula vacía + peso de la muestra fresca, *CPMF*) en una balanza de precisión. Se deshidrataron en la

estufa anterior a 110 °C hasta peso constante (aproximadamente 3 días). Las muestras deshidratadas se enfriaron en el desecador, a vacío, de vidrio durante 20 min y se pesaron (peso de la cápsula vacía + peso de la muestra seca, *CPMS*) en la misma balanza. El contenido de humedad (*H*) se determinó por diferencia entre el peso de la muestra fresca y el de la desecada. El extracto seco (*ES*) se calculó restando el contenido de agua del peso del producto cárnico.

Las expresiones usadas para los cálculos de la humedad y del extracto seco fueron las siguientes:

$$\% H = \frac{CPMF - CPMS}{CPMF - CP} \times 100$$

$$\% ES = 100 - \% H$$

La determinación de cenizas se hizo en las mismas muestras una vez secas, introduciendo las cápsulas en un horno mufla Herausmod. MR 170 (Hanau) a 550 °C hasta peso contante *CPC* (peso de la cápsula vacía + peso de las cenizas), aproximadamente 2 días, calculándose el porcentaje de cenizas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{CPC - CP}{CPMF - CP} \times 100$$

3.7.4 Capacidad de retención de agua (CRA)

Existen diversos métodos para determinar la CRA del músculo, basados, en su mayor parte, en la aplicación de una fuerza de presión o succión, para provocar la expulsión de cierta cantidad de agua de una matriz cárnica. Aunque algunos de estos métodos presentan ciertas ventajas, lo cierto es que no es posible comparar los valores absolutos obtenidos con unos y otros, ya que difieren en el fundamento y forma de proceder (Trout, 1988). En este trabajo, la CRA se ha determinado mediante métodos basados en la pérdida de peso (por goteo y por cocinado) y en la compresión entre placas.

3.7.4.1 Métodos basados en la pérdida de peso

3.7.4.1.1 Pérdida por goteo

La pérdida de exudado por goteo se determinó de acuerdo a Hönikel (1998). Para ello, filetes de lomo de alrededor de 25 g se pesaron (PO) y se colocaron sobre una superficie perforada, dejándolas escurrir durante 12 h en una cámara frigorífica termostatada a 4 °C. Tras este tiempo, las muestras se secaron suavemente con papel de filtro y se pesaron de forma inmediata para evitar evaporaciones (PF). La pérdida de exudado (PE) se expresó como porcentaje del peso inicial, según la siguiente expresión:

$$\% PE = \frac{(PO - PF)}{PO} \times 100$$

3.7.4.1.2 Pérdida por cocinado

La pérdida de peso durante el cocinado se determinó de acuerdo a Aaslyng y col. (2003). Muestras de aproximadamente 2 cm de espesor se cocinaron en una plancha (Chef Tm pro 2300, Princess, Tilburg, Netherlands) a 160 °C, dándoles la vuelta cada 30 s. La temperatura se determinó en el centro de cada muestra con una sonda Testo modelo 735 (Testo S.A., Barcelona, España). Los filetes se retiraron de la plancha cuando la temperatura en su interior alcanzó 70 °C. Las muestras se pesaron antes (PO) y después (PF) del cocinado, estimando la pérdida de peso de acuerdo con la expresión anterior.

En ambos casos, la pérdida de exudado (PE) tanto en las muestras crudas controles (0 kGy) como en las tratadas con electrones acelerados con dosis de 0, 1 y 2 kGy se determinó tras el tratamiento (día 0) y a los 5 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C).

3.7.4.2 Método de compresión entre placas

Entre los distintos métodos de compresión para medir la capacidad de retención de agua de la carne, el de la compresión en placas es, quizás, el más utilizado; fue propuesto por Grau y Hamm (1953). Se basa en la medida del agua liberada por una muestra de carne colocada entre dos placas (vidrio o metacrilato) al aplicarle una presión elevada (por ajuste con tornillos). Para ello, se tomó una muestra de aproximadamente 0,3 g de peso, libre de grasa visible y de tejido conjuntivo, del músculo *longissimus dorsi* que se colocó sobre papel de

filtro (Whatman No. 1, 125 mm) previamente secado y se comprimió el conjunto entre las dos placas (12,5 x 7 cm), en este caso de metacrilato, mediante tornillos que atraviesan dichas placas y se aprietan manualmente con tuercas (Figura 3.3). Transcurridos 5 min, se retiró con cuidado el papel de filtro mojado por el fluido expulsado de la carne. Como resultado de la compresión se formó una delgada película de carne, y el agua liberada por ésta quedó absorbida por el papel de filtro, apareciendo en el mismo un área circular mojada en torno a la película de carne. El agua liberada es proporcional a la diferencia del área del círculo empapado (A_T) y a la de la ocupada por la película de carne (A_C), las cuales pueden determinarse fácilmente con un planímetro. La cantidad de agua liberada puede obtenerse mediante la siguiente expresión:

$$\text{Agua liberada (mg)} = \frac{A_L \times 0,84}{0,984}$$

siendo la superficie correspondiente al agua liberada (A_L) la diferencia entre A_T y A_C expresada en cm^2 .

Asumiendo que la carne presenta un contenido total de agua del 75% antes de ser sometida a presión, los 0,3 gramos de carne empleada tienen 0,225 gramos de agua, por lo que el agua retenida se calcula como la diferencia entre el agua total y la liberada:

$$\text{Agua retenida (g)} = \text{Agua total (g)} - \text{Agua liberada (g)}$$

A partir de estos datos, la CRA se calculó como el porcentaje de agua retenida respecto al contenido de agua total del producto, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Agua retenida} = \text{Agua retenida} \times \frac{100}{0,3}$$

Se realizaron cuatro réplicas de las determinaciones en el día 0 y al final de la vida útil del lomo de cerdo, tanto fresco como adobado.

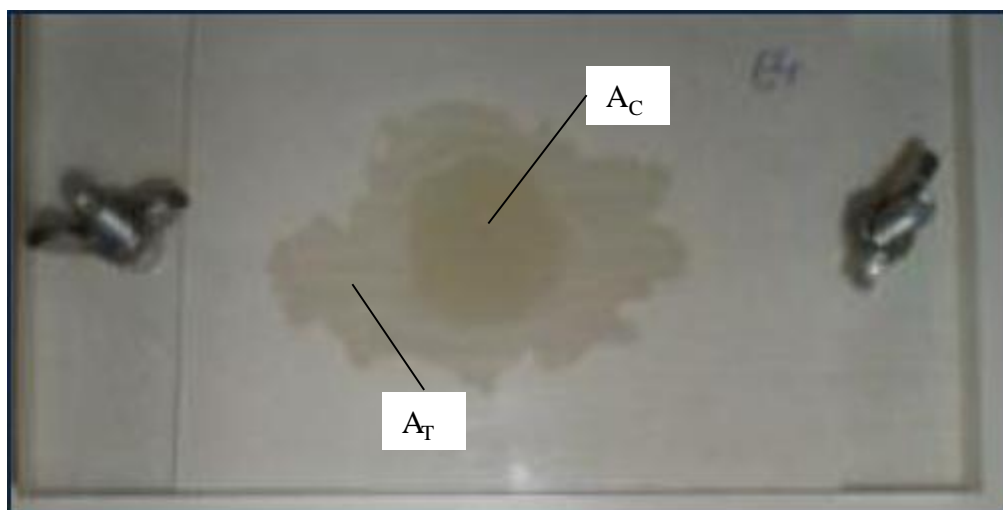


Figura 3.3 Método de compresión en placas de una muestra de carne para la determinación de su capacidad de retención de agua

3.7.5 Determinación instrumental del color

El color se midió con un colorímetro triestímulo Minolta mod. CR-200 (Minolta Co. Osaka, Japan) dotado de una fuente de iluminación D-65. Se utilizó el sistema CIELAB, basado en las coordenadas cromáticas: L^* (luminosidad), a^* (tendencia al rojo, zona entre el rojo y el verde) y b^* (tendencia al amarillo, zona entre el amarillo y el azul).

El instrumento se calibró con una placa de color rosado ($L^* = 44,88$; $a^* = 25,99$ y $b^* = 6,67$) de parámetros con valores normalizados.

Los posibles cambios en el color debido al tratamiento con radiación β y su evolución tras su exposición al aire se determinaron, en condiciones de luz natural, sobre la superficie de filetes de lomo de unos 2 cm a 25 °C, a tres tiempos diferentes (0, 4 y 24 h tras la apertura del envase). Después de la primera medida del color, los filetes se mantuvieron sin protección y bajo condiciones de temperatura (6 ± 2 °C) y humedad relativa ($64 \pm 2\%$) similares a la que presenta la carne cuando se encuentra en una vitrina refrigerada o un refrigerador doméstico. Este proceder se realizó a los 0, 5 y 10 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C). Se hicieron 8 réplicas de cada determinación.

El espacio de color definido como CIE $L^*a^*b^*$ (CIE, 1971) representado en la figura 3.4 ha sido estandarizado universalmente.

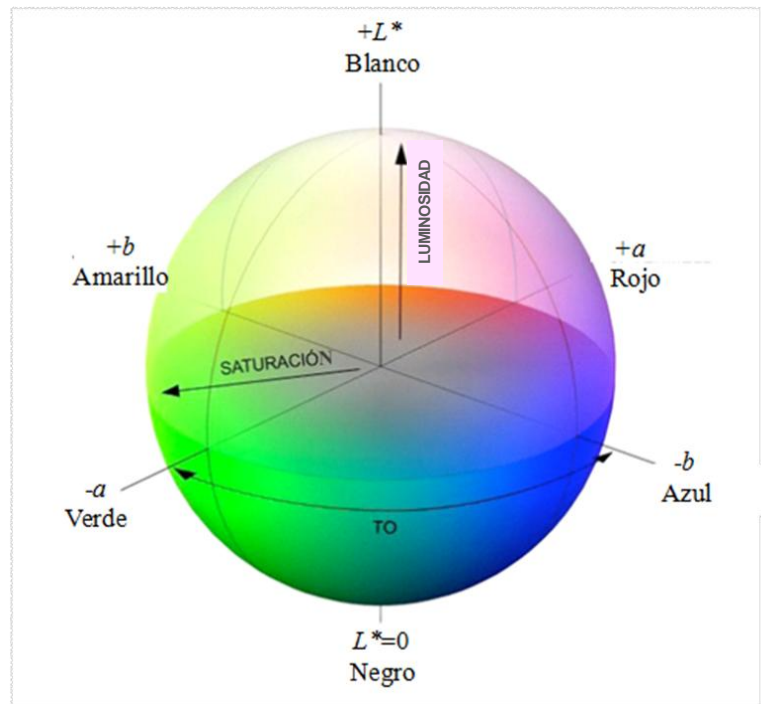


Figura 3.4 Representación gráfica del sistema CIE $L^*a^*b^*$

Se trata de un sistema cartesiano en el que existen tres ejes:

- L^* : es el eje vertical y representa la medida de la luminosidad de un color, variando desde cero para el color negro hasta 100 para el blanco.
- a^* : es uno de los ejes horizontales y representa una medida del dominio del rojo o verde. En función de que la tendencia sea mayor o menor al rojo o al verde, el valor de este parámetro será positivo o negativo, respectivamente.
- b^* : es el otro eje horizontal, perpendicular al anterior. Valores positivos de este parámetro indican mayor tendencia al amarillo y negativos, al azul.

El espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ permite realizar una transformación particular, de forma que cambios en la saturación y/o en la tonalidad de un color pueden interpretarse directamente. Si en lugar de emplear las coordenadas cartesianas a^* y b^* , se emplean coordenadas polares, se llega al variante de espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ llamado CIE $L^*C^*h^*$ donde:

- C^* : es la medida de saturación o croma de un color (*índice de saturación*) y se calcula como $(a^{*2} + b^{*2}) \times 0,5$. De esta forma, un valor de 0 indica un color acromático, sin ninguna orientación hacia rojo, verde, azul o amarillo; y un valor alto de C^* es un color altamente saturado.

- h^* : es el ángulo que mide la tonalidad (*ángulo Hue*) y se calcula como cociente de b^*/a^* . Indica la orientación relativa del color respecto al origen 0° . Si la totalidad del círculo a^*b^* se divide en 360° y se define el origen 0° en la posición a^* positiva y $b^* = 0$, es decir, donde se situaría un color estrictamente rojo, podemos desplazarnos en sentido contrario a las agujas del reloj, de forma que un color estrictamente amarillo se encontraría en el ángulo 90° , un verde estricto en el 180° y un azul estricto en el 270° .

3.7.6 Determinación de atributos de textura

Entre los métodos instrumentales para la determinación de la textura, el más extendido es, sin duda, el ensayo de imitación de doble compresión denominado análisis de perfil de textura (*Texture Profile Analysis*, TPA). Se trata de un procedimiento instrumental para medir, cuantificar y establecer parámetros relacionados con la textura, aunque la magnitud de los mismos se ve influida por las variables introducidas en las mediciones, como la tasa de deformación (Peleg, 1976; Fellows, 2000). Es necesario, por tanto, realizar una evaluación bajo condiciones normalizadas para obtener una información más objetiva (Osorio y col., 2005).

De acuerdo con Bourne (1979), este análisis es el ejemplo más notable que correlaciona las pruebas objetivas con valores sensoriales. Tunick (2000) define el análisis de perfil de textura como una prueba imitativa en la cual se pretende reproducir la masticación de un producto, siendo útil en el proceso de control de calidad y elaboración de alimentos.

En los ensayos de tracción (también denominados ensayos de tensión simple a tracción, o ensayos de tracción uniaxial) se estudia el comportamiento de un material sometido a tracción creciente y progresiva hasta conseguir la rotura (ensayos destructivos) o hasta un nivel de deformación determinado. Se considera que el ensayo de tracción es el más adecuado para estudiar el comportamiento mecánico de materiales (Purslow, 1985; Hönikel, 1998; Bourne, 2002), así como su relación con la estructura.

En el presente trabajo, el ensayo de tracción y el análisis del perfil de textura se llevaron a cabo en un texturómetro Stable Micro Systems mod. TA-XT 2i (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) controlado desde un ordenador Pentium II mediante el software Texture Exponent 32, versión 6.0.7.0. Para los ensayos se utilizó una célula de

carga de 5 Kg y se procedió de acuerdo a los procedimientos descritos por Bourne (1978) y Szczesniak (1986). Todas las determinaciones se realizaron a 22 °C.

3.7.6.1 Análisis del perfil de textura (TPA)

Para realizar esta prueba de doble compresión se utilizó una sonda cilíndrica de aluminio de superficie plana (2,5 cm de diámetro) en su extremo terminal, mod. P/25, que presiona a la muestra colocada sobre una plataforma de aluminio mod. HDP/90.

Para todos los análisis, se cortaron muestras cilíndricas de aproximadamente 1,5 cm de altura y 2,0 cm de diámetro con un sacabocados de acero inoxidable de esas dimensiones. Las probetas se cortaron transversalmente a la dirección de las fibras musculares.

Una vez calibrada la fuerza con una pesa de 5 kg, se ajustó la sonda de compresión haciéndola descender hasta el punto de contacto con la placa sobre la que se deposita la muestra. Se establecieron las siguientes condiciones de análisis:

Velocidad de la sonda durante la compresión: 0,2 cm/s

Velocidad de ascenso de la sonda: 1 cm/s

Grado de compresión de la muestra: 50%

En el ensayo se realizaron dos compresiones consecutivas de la muestra, obteniéndose una gráfica que representa la fuerza aplicada (ordenadas) frente al tiempo de ensayo (abscisas) (Figura 3.5).

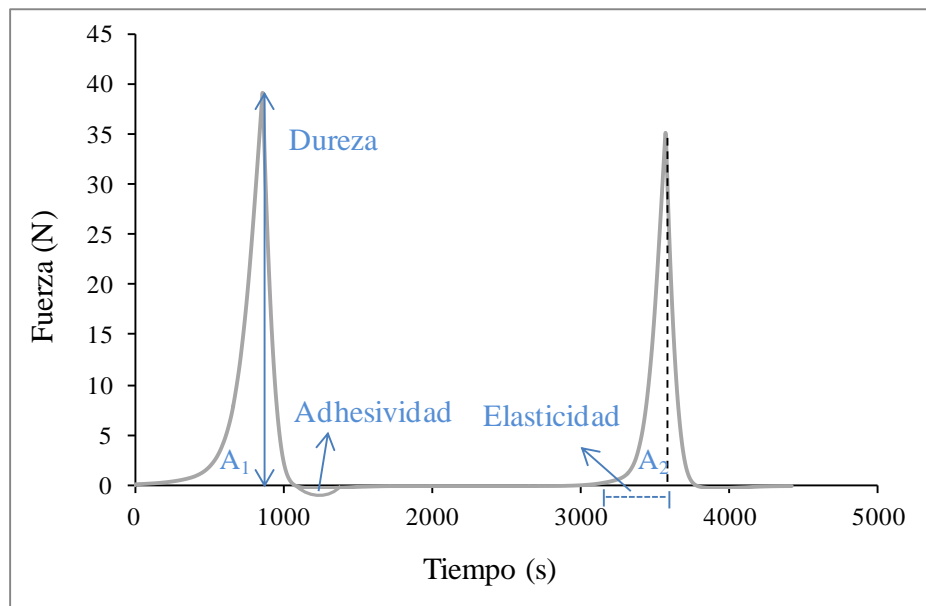


Figura 3.5 Representación gráfica de un Análisis de Perfil de Textura (TPA) y principales parámetros obtenidos

Una vez concluido el ensayo, se definieron los siguientes parámetros de textura:

- Dureza: equivale a la altura máxima de la gráfica obtenida en el primer ciclo de compresión; representa la fuerza máxima (N) necesaria para producir una cierta deformación.
- Adhesividad: es el área negativa de la gráfica tras producirse el primer ciclo de compresión; representa la fuerza necesaria (N x s) para separar la superficie compresora de la sonda, de la muestra después de haberla sometido a la compresión inicial.
- Elasticidad: es el área recuperada por la muestra entre el final de la primera compresión y el principio de la segunda; representa la capacidad de la muestra de retornar a su forma original tras haber aplicado la presión. Su valor es la diferencia, en metros (m), entre las alturas resultantes de la primera y la segunda actuación de la sonda.
- Cohesividad: es la relación entre el área positiva alcanzada durante la segunda compresión y la obtenida en la primera (A_2/A_1); representa el grado en que una muestra puede deformarse sin llegar a la ruptura. A diferencia de los demás parámetros, es adimensional.
- Gomosidad: se define como el producto de la dureza y la cohesividad; representa la fuerza necesaria (N) para desintegrar una muestra antes de su deglución.

- **Masticabilidad:** es la combinación de la gomosidad y la elasticidad (producto de la dureza por la cohesividad y por la elasticidad); representa el trabajo en julios (J) necesario para masticar una muestra, rindiendo un material listo para su deglución.

Se efectuaron cinco réplicas de cada determinación.

3.7.6.2 Ensayo de tracción

Para realizar los ensayos de tracción, de las muestras de lomo se obtuvieron lonchas utilizando una cortadora eléctrica (TIPO ES 300 Modelo DOM, Beckers Italy) a partir de las cuales se prepararon piezas rectangulares (alrededor de 9 cm de largo, 3 cm de ancho y 0,2-0,4 cm de espesor) utilizando un bisturí. Estas superficies se emplearon para la preparación final de las probetas de ensayo (alrededor de 6-7,5 cm de largo, 2 cm de ancho y 0,2-0,4 cm de espesor) obtenidas utilizando un molde de superficie cortante diseñado para este fin. Todas las muestras fueron cortadas en paralelo a la dirección de la fibra. Después del corte, la anchura y el grosor en el centro de las probetas se comprobaron con un calibre Vernier (Dígito Cal, Tesa, Brown y Sharpe). Estas dimensiones se consideraron para calcular el área de la sección transversal original de la probeta.

Para la realización de los ensayos, las muestras se colocaron entre dos mordazas o pinzas de cierre excéntrico (A/TGT), para evitar que la muestra resbale o se rompa por el punto de sujeción, fijadas a la base del analizador de textura y a la célula de carga. La muestra se colocó de tal forma que cada uno de sus extremos quedaba sujeto por una de las pinzas (véase figura 3.6). La separación inicial de las pinzas era de 1,7 cm y la velocidad de la cruceta, de 0,1 cm/s hasta la rotura. La fuerza de rotura se tomó como la altura del pico de fuerza máxima (N) requerida para fragmentar la muestra. La resistencia a la rotura (N/cm^2) se calculó dividiendo la fuerza de rotura entre la sección transversal del área (espesor x anchura) de las porciones (Hönikel, 1998). Para el cálculo de la resistencia a la rotura se consideraron sólo los resultados de las muestras que se fracturaron en la zona central de las probetas. El ensayo se continuó hasta tener al menos tres valores de resistencia a la rotura para cada muestra.

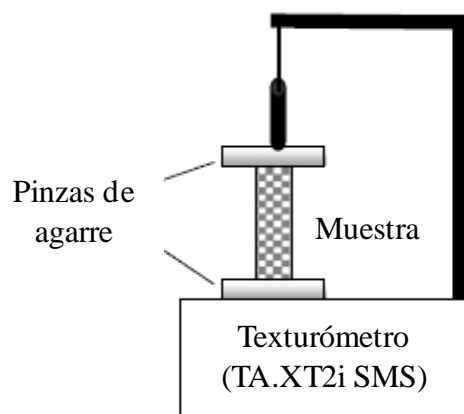


Figura 3.6 Esquema de colocación de la muestra para realizar un ensayo de tracción

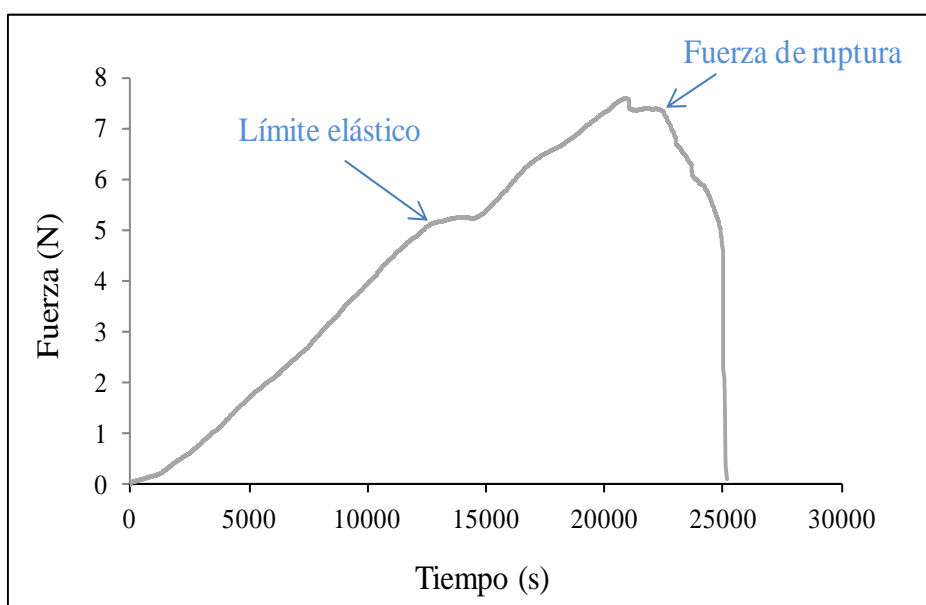


Figura 3.7 Representación gráfica de la curva de deformación obtenida en un ensayo de tracción

Ambas pruebas se realizaron después del tratamiento (día 0) y a los 5 y 10 días de almacenamiento a 4 °C. En el caso de las muestras almacenadas a 8 °C, los ensayos se hicieron únicamente los días 0 y 5, ya que su vida útil fue más corta.

3.7.7 Determinación de los atributos sensoriales

Para el análisis de las propiedades sensoriales de los lomos de cerdo fresco y adobado, y el estudio de las modificaciones ocasionadas por el tratamiento ionizante (1 y 2 kGy), las muestras se degustaron en la sala de catas del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Madrid, construida de

acuerdo a la norma ISO/DP 66.58 (ISO, 1981a). Consta de un área de preparación de muestras y una cocina totalmente equipada. Dispone de 6 cabinas independientes entre sí y comunicadas con la zona de preparación de muestras mediante ventanas giratorias con bandeja. Cada cabina está dotada de una mesa de trabajo, una pila, un grifo con agua corriente, iluminación blanca o roja y terminales que envían los datos a un ordenador.

El panel de catadores estuvo compuesto por 20 personas (indistintamente mujeres y hombres) seleccionados entre los miembros del Departamento.

Se eligieron dos pruebas discriminativas de diferenciación (triangular y de ordenación) y una prueba descriptiva.

En la **prueba triangular** (ISO TC 34/SC 12, 1981b) se presentaron a los miembros del jurado un trío de muestras codificadas, de las cuales dos eran iguales y una diferente. El catador tenía que identificar la diferente y señalar si verdaderamente había encontrado diferencias o si, por el contrario, había contestado aleatoriamente. En esta prueba, la probabilidad de acertar al azar es de $1/3$.

En la **prueba de ordenación** se ofrecieron a los evaluadores diversas muestras que debían ordenar, sin posibilidad de omisión o repetición, de acuerdo a una determinada característica sensorial (apariencia, olor y sensación en boca) según su grado de proximidad a las que típicamente caracterizan al producto. La evaluación de los resultados se realizó teniendo en cuenta la puntuación final alcanzada que dependió del orden asignado por cada evaluador a las distintas muestras en cada análisis. La cuantificación del análisis se hizo otorgando a la muestra mejor evaluada una puntuación equivalente al número de muestras sometidas a análisis. La muestra que ocupó el segundo lugar recibió un punto menos, siguiéndose esta pauta hasta llegar a la última que recibió un punto.

El propósito de la **prueba descriptiva** era identificar y cuantificar propiedades sensoriales, lo que permitió evaluar integralmente los atributos (sabor, olor, textura, etc.) característicos del producto. Para ello, se solicitó a los evaluadores que definieran de forma precisa distintas particularidades (color, brillo, olor, sabor, regusto, sensación en boca, textura, etc.).

En los tres tipos de ensayos se evaluaron, en pruebas separadas, la apariencia, el olor y la sensación en boca. Para llevar a cabo la última prueba, se cocinaron fracciones

homogéneas de filetes de lomo durante 2 min por cada lado en una plancha previamente calentada a 150 °C, alcanzándose una temperatura de aproximadamente 70 °C en el interior de los filetes. Se pidió a los catadores que tomaran un poco de pan sin sal y después se enjuagasen la boca con agua antes de catar cada muestra, incluso antes de la primera. Para el estudio de la apariencia y el olor se utilizaron muestras frescas, sin cocinar. La valoración de la apariencia se realizó con luz blanca y la del olor y sabor, ambientando la cabina con luz roja para evitar la influencia del color en el juicio.

Únicamente se sometieron a evaluación sensorial las muestras almacenadas en refrigeración (4 °C). Los ensayos se realizaron el día 0 (inmediatamente después del tratamiento) y a diferentes tiempos hasta el final de la vida útil del producto.

3.7.8 Análisis de fosfolípidos

Para la determinación de fosfolípidos de los lomos de cerdo fresco y adobado se extrajo su componente lipídico siguiendo el procedimiento de Folch y col. (1957) (Figura 3.8) usando reactivos de calidad analítica, proporcionados por Merck (Darmstadt, Germany). Se pesaron 10 g de muestra y se cortaron en trozos pequeños con una picadora Ufesa BP 4515 (BSH Ufesa Industrial S.A., Navarra, España). Posteriormente, se homogeneizaron mediante agitación con 50 mL de una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (v/v), seguido por dos extracciones adicionales, cada una con 50 mL de la mezcla. Se añadieron 100 mL de agua destilada y el conjunto se filtró a través de sulfato de sodio anhidro, obteniéndose un residuo sólido y un filtrado. Se continuó la extracción en el residuo sólido con éter dietílico (3 x 50 mL) y posterior filtración. A continuación, se desechó el residuo sólido y se unieron los filtrados resultantes de las dos fases. La mezcla se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio (Heidolph) a una temperatura de 30 °C bajo presión reducida.

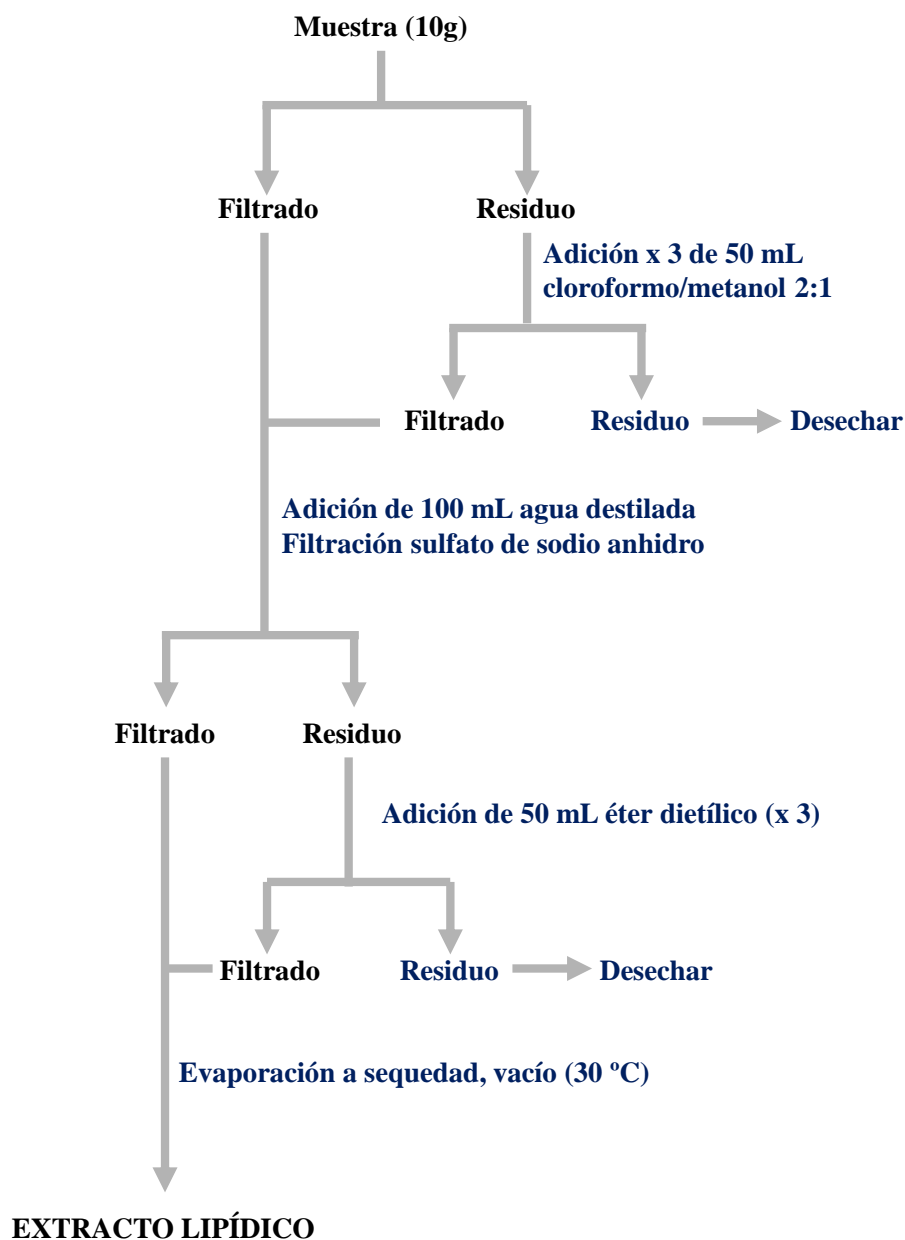


Figura 3.8 Esquema de la obtención del extracto lipídico de la muestras cárnicas

Posteriormente, se realizó una extracción en fase sólida (SPE) para separar los fosfolípidos del extracto lipídico total (Figura 3.9). Para ello, se disolvieron 200 mg del extracto anterior en 1 mL de n-hexano que se hizo pasar a través de un cartucho de gel de sílice "Supelclean" LC-Si SPE 6 mL (1g) (Supelco Bellefonte, PA, EEUU), previamente acondicionado con 10 mL de n-hexano. A continuación, el cartucho se lavó con 10 mL de una mezcla de n-hexano:éter dietílico 4:1 (v/v) para eliminar los ácidos grasos libres, y con 18 mL de cloroformo:2-propanol 2:1 (v/v) para eluir los hidrocarburos, ésteres de colesterol y triacilgliceroles presentes. Llegado a este punto, se procedió a la recuperación

de los fosfolípidos añadiendo al cartucho 10 mL de metanol seguidos de 10 mL de metanol:cloroformo:agua 5:3:2 (v/v/v).

La fracción recuperada se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio a 30 °C, bajo presión reducida, obteniéndose un residuo que se resuspendió en 0,2 mL de cloroformo para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución.

3.7.8.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La separación de los diferentes fosfolípidos presentes en el residuo anterior se realizó, siguiendo el procedimiento descrito por Narváez-Rivas y col. (2011), mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1100 (Palo Alto, CA, EEUU) equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático con volumen de inyección variable (0 a 100 µL), un horno de Peltier y un detector de dispersión de luz por evaporación ELSD 2000, Alltech (Deerfield, IL, EEUU). El gas de nebulización empleado en el detector fue nitrógeno. El sistema estaba conectado a un ordenador Hewlett-Packard (Palo Alto, California, EEUU) que permitió en todo momento vigilar su correcto funcionamiento.

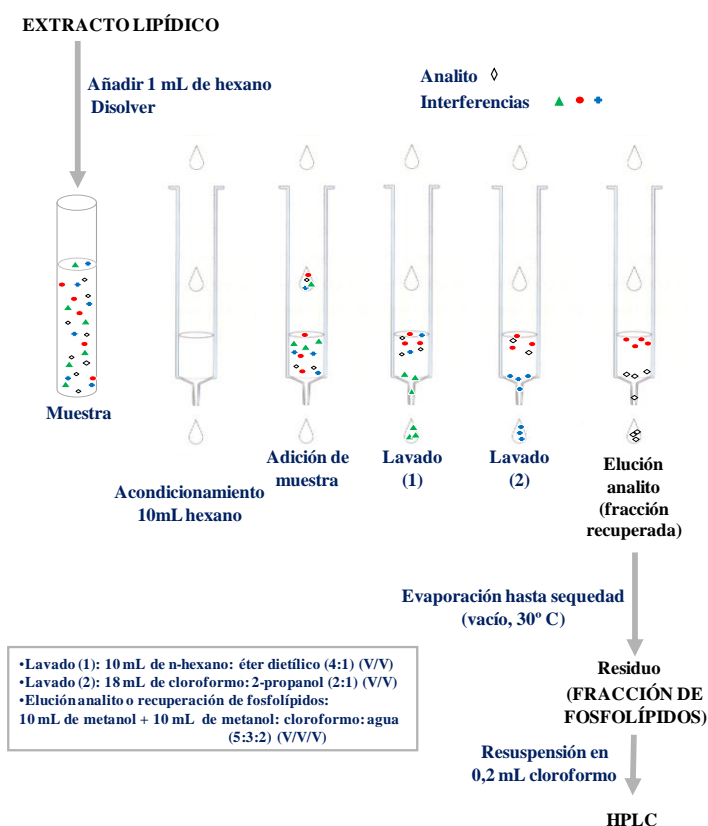


Figura 3.9 Esquema de la extracción de fosfolípidos a partir de la fracción lipídica

La separación se realizó en una columna (Chromolith Performance Si columna Merck) a temperatura constante (25 °C). Se usaron como agentes eluyentes 2 soluciones: A [cloroformo:metanol:solución de amoníaco, 80:19,5:0,5 (v/v/v)] y B [cloroformo:metanol:triethylamina:agua, 70:25:0,5:4,5 (v/v/v/v)]. El cloroformo y el metanol, ambos de calidad HPLC (LiChrosolv®), fueron suministrados por Merck. La mejor separación se consiguió añadiendo hasta el 40% de solución B en los primeros 5 min., manteniéndose así durante 2 min. adicionales. Posteriormente, se aumentó gradualmente hasta alcanzar el 100% a los 13 min., manteniéndose esta concentración hasta el minuto 20. En los 5 min. siguientes, el porcentaje de la disolución B se redujo hasta restablecer las condiciones iniciales de la cromatografía. El volumen inyectado fue 50 µL y la velocidad de flujo se mantuvo constante a 1 mL/min durante los 25 min. que duró la cromatografía. Al finalizar el proceso, se realizó una post-carrera de 5 min. para equilibrar la columna.

Las condiciones del detector se optimizaron mediante inyección por triplicado de 5 µL de una solución patrón de fosfolípidos suministrada por Supelco, compuesta por fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), y lisofosfatidilcolina (LPC), estableciéndose un flujo de 1,5 L/min y una temperatura de 110 °C. También se utilizaron como patrones triethylamina (Et3N), cardiolipina (CL) y esfingomielina (SPH), adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

La identificación de los fosfolípidos se efectuó basándose en el área de los picos resultantes de la cromatografía (figura 3.10). La cuantificación se realizó comparando dichas áreas con las de las muestras patrones cromatografiadas en las mismas condiciones.

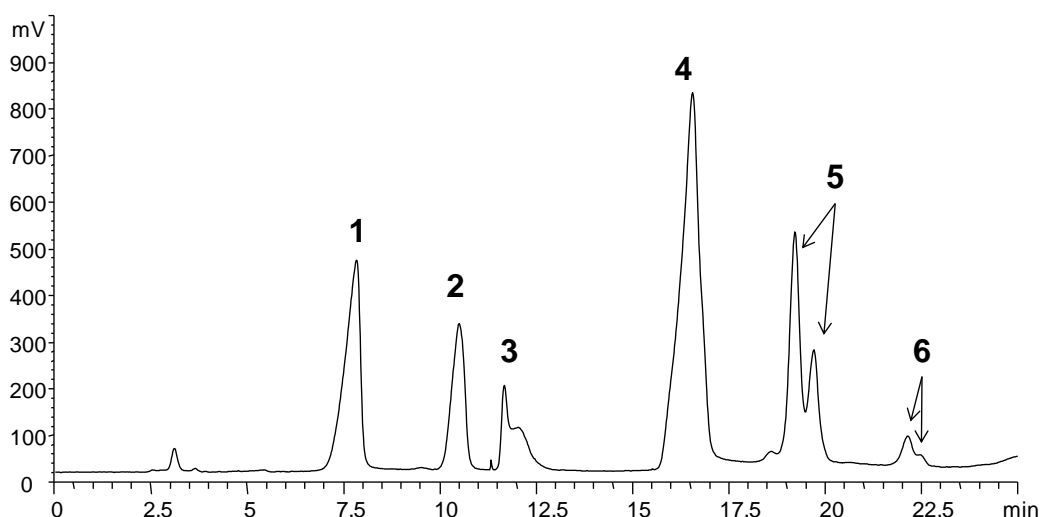


Figura 3.10 Perfil cromatográfico de la composición de fosfolípidos de grasa intramuscular de lomo de cerdo obtenido en HPLC, ejemplarizada con una muestra procedente de lomo fresco (envasado al vacío) tratado con 0,5 kGy (1. CL, 2. PE, 3. PI, 4. PC, 5. SPH, 6. LPC)

3.7.9 Análisis de compuestos volátiles

La extracción de compuestos volátiles se realizó en espacio de cabeza dinámica (purga y trampa), de acuerdo con el método descrito por Narváez-Rivas y col. (2010).

Se partió de 1,5 g de muestra de lomo que se trituraron y se colocaron en un vial con boca esmerilada que se introdujo en un *termoblock* a una temperatura de 45 °C. De esta forma, se consiguió la saturación de la atmósfera del vial con los volátiles, los cuales se arrastraron durante exactamente 14 min. con corriente de nitrógeno (350 mL/min a temperatura constante 35 °C) hasta una trampa de “tenax” (estructura polimérica que permite la recogida de compuestos volátiles escasamente hidrofílicos).

3.7.9.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS)

Para la determinación de los compuestos volátiles se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian 3800) con inyector 1079 para purga y trampa con el modo de barrido completo, desde 50 a 600 amu por 1 exploración/s. El sistema estaba acoplado a un espectrómetro de masas, con un detector de trampa iónica Saturno 2000 (Varian), y un concentrador de purga y trampa TEKMAR velocidad XPT (Thousand Oaks, CA, EEUU). Se utilizó una columna capilar de sílice fundida Supelcowax-10 (60m de longitud x 0,25mm de diámetro interno x 0,25µm espesor de la película) (Supelco). El conjunto cromatográfico estaba controlado mediante el software MS Varian Workstation versión 6.3.

Para su análisis, los volátiles se liberaron de la trampa de “tenax” en un cromatógrafo de gases mediante desorción térmica a 225 °C durante 1 min y se enviaron al inyector del cromatógrafo mantenido a 150 °C.

Las condiciones de la cromatografía fueron las descritas por Narváez-Rivas y col. (2010):

- Gas portador: hidrógeno, con un flujo constante de 1,6 mL/min.
- Temperatura del inyector: se mantuvo constante a 250 °C. La relación entre la interfase de división de flujo (*open split*) y la inyección fue 1:5.
- Temperatura del horno: se mantuvo a 40 °C durante 14 min., y a continuación se efectuaron tres rampas de temperatura; en la primera se aumentó la temperatura a 91 °C a la velocidad de 1 °C/min; en la segunda, se aumentó a 201 °C a 10 °C/min; y en la tercera, la temperatura se aumentó a 5 °C/min hasta llegar a 220 °C, la cual que se mantuvo durante 20 min.

Las condiciones de funcionamiento de la MS fueron las siguientes:

- Las temperaturas de la fuente de iones y de la línea de transferencia fueron 200 y 290 °C, respectivamente.
- Impacto electrónico de 70 eV, con una resolución de 1 y la corriente de emisión 250 µA.
- Tiempo de permanencia y retardo entre canales fue de 0,08 y 0,02 s, respectivamente.

3.7.9.2 Caracterización de los compuestos volátiles

La identificación de los compuestos volátiles presentes en las muestras se realizó comparando los tiempos de retención con los de las sustancias patrones utilizadas. La identificación de algunos compuestos se confirmó comparando su espectro con los del Instituto Nacional de Normas (NIST) y los de la biblioteca Wiley. La verificación de los resultados se realizó con patrones de Sigma-Aldrich y Fluka (St. Louis, MO, EEUU).

3.7.9.3 Análisis cuantitativo

La cuantificación de los compuestos volátiles se realizó comparando las áreas obtenidas para cada uno de ellos, con el área del patrón interno (butirato de isoamilo), que se preparó con aceite de girasol (14,3407 mg/100 g de aceite). Se utilizó butirato de isoamilo como referencia para calcular el tiempo de retención relativo debido a que, en las condiciones establecidas, su tiempo de retención fue de 29,52 min.

3.7.10 Análisis de óxidos de colesterol

3.7.10.1 Reactivos y estándares

Reactivos utilizados: Hexano (fracción de éter de petróleo) de calidad analítica, Multisolvant® tm HPLC, ACS, suministrada por Scharlau (Barcelona, España). Cloroformo, metanol, dietiléter e hidróxido de potasio, de calidad analítica, fueron proporcionados por Merck.

Acetona y piridina anhidra, de calidad analítica, fueron proporcionados por Merck. El clorotrimetilsilana y hexametildisilazano fueron suministrados por Fluka (Seelze, Germany) y la betulina, que fue utilizada como estándar interno, por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

Estándares utilizados para la identificación de los COPs: Colestan-5 α -6 α -epoxi, Colestan-3 β -5 α -6 β -triol, 25-hidroxicolesterol y 5-Colesten-3 β -ol-7-ona, fueron adquiridos de Sigma.

3.7.10.2 Extracción de COPs

Para el estudio de COPs de los lomos de cerdo fresco y adobado, se llevó a cabo la extracción lipídica siguiendo el procedimiento de Folch y col., (1957), descrito anteriormente (véase apartado 3.7.8).

A continuación, se realizó la extracción de la fracción insaponificable de acuerdo con el método descrito por Narváez-Rivas y col. (2014). Para ello, se partió de 0,2 g de grasa, extraída de la muestra de lomo a analizar, se colocó en un tubo de vidrio Pyrex, en el cual previamente se había añadido 1 mL de solución de patrón interno (0,16 mg de betulina/mL de cloroformo) y se evaporó en corriente de nitrógeno.

La saponificación de la mezcla se llevó a cabo con 5 mL de una solución de etanol en hidróxido de potasio (2M) que contenía un 20% (v/v) de agua en un horno (Pinzuar LTDA, ref. PG 1901) a 85 °C durante 45 min, con circulación de aire, y se enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente, para realizar la extracción, se añadieron 10mL de agua destilada y la solución fue transferida a un embudo de decantación de 50 mL. A continuación, se obtuvieron los extractos con éter dietílico (3 x 10 mL). Dichos extractos fueron mezclados en otro embudo y se lavaron con 10 mL de agua destilada, repetidas veces, hasta alcanzar un pH neutro en el lavado. La solución de éter dietílico y COPs se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó hasta sequedad en un evaporador rotatorio (Heidolph) a 30 °C bajo presión reducida.

La fracción de COPs se separó de la fracción insaponificable mediante SPE, de acuerdo con el método descrito por Narváez-Rivas y col., (2014). La fracción insaponificable completa se disolvió en 0,5 mL de hexano/éter dietílico 75:25 (v/v) y se pasó a través de un cartucho de gel de sílice Supelclean LC-Si SPE 6 mL (500 mg) (Supelco), previamente acondicionado con 10 mL de n-hexano. A continuación, el cartucho se lavó con 4 mL de n-hexano:éterdietílico 75:25 (v/v) para eliminar los compuestos con menor polaridad. Para eluir los COPs presentes se lavó con 3 mL de n-hexano:éterdietílico 60:40 (v/v) y 4 mL de acetona:metanol 60:40 (v/v), obteniéndose una fracción que se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio a 30 °C, bajo presión reducida. Mediante la adición de 0,15 mL de piridina:clorotrimetilsilano:hexametildisilazano 9:3:1 (v/v/v), a temperatura ambiente durante 20 min, se obtuvieron derivados de éter trimetilsilil (TMSE).

3.7.10.3 Separación (GC) e identificación de COPs (GC/MS)

El análisis de los diferentes COPs obtenidos en el residuo anterior se realizó, de acuerdo al método descrito por Narváez-Rivas y col. (2014), mediante un cromatógrafo de gases Agilent 7890^a, equipado con un inyector sobre columna en frío y un detector de ionización de llama (FID); con una columna capilar SPB-5 (30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro x 0,25 µm de espesor de la película) (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU) y un inyector automático (Agilent 4513AT).

Se establecieron las siguientes condiciones cromatográficas:

- Gas portador (hidrógeno), con una presión de cabeza de columna constante de 10 psi.
- Temperatura del inyector en modo *splitless* (350 °C) con un flujo de purga de 15 mL/min en 0,5 min.
- Temperatura del horno: temperatura inicial de 90 °C durante 0,5 min. y a continuación se efectuaron dos rampas; en la primera se aumentó la temperatura hasta 290 °C, a una velocidad de 30 °C/min; una vez que la columna alcanzó 290 °C, comienza la segunda rampa, hasta 300 °C a una velocidad de 1 °C/min y se mantuvo durante un tiempo total de 25 min.
- Temperatura del detector: 360 °C, y los flujos de aire e hidrógeno fueron 300 y 30 mL/min respectivamente. Como gas auxiliar se utilizó nitrógeno, con una velocidad de flujo de 30 mL/min.

Para la identificación de los COPs, se utilizó un cromatógrafo de gases Varian-CP3800 acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones Saturno 2000 (Varian). El GC estaba equipado con un automuestreador CP8400. La separación se llevó a cabo en una columna capilar DB-5MS (30 m de longitud x 0,25 mm diámetro x 0,25 µm de espesor de película) (J & W Scientific, Folsom, CA, EEUU) con un caudal de 1 mL/min de hidrógeno de alta pureza como gas portador.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Temperatura del inyector: 350 °C. La muestra se inyectó en modo *splitless*, con una relación de 1:10 a 0,5 min. y con un volumen de inyección de 1 mL.
- La secuencia del programa de temperatura del horno fue la misma que para GC-FID.

Condiciones de funcionamiento de MS:

- Temperaturas de la línea de transferencia y del colector- 290 y 180 °C, respectivamente.
- Impacto electrónico -70 eV y corriente de emisión -10 µA.
- Tiempo de permanencia y retardo entre canales -0,08 s y 0,02 s, respectivamente.

Para el procesamiento de los resultados se utilizó el programa Software Varian MS Workstation (versión 6.30).

3.7.10.4 Caracterización y análisis cuantitativo de los COPs

La cuantificación de cada uno de los COPs identificados se llevó a cabo utilizando curvas de calibración y usando betulina como patrón interno. Para cada compuesto se emplearon curvas de calibración obtenidas enriqueciendo alícuotas de grasa de lomo de cerdo fresco y adobado, con diferentes concentraciones de Colestan-5 α -6 α -epoxi, Colestan-3 β -5 α -6 β -triol, 25-hidroxicolesterol y 5-Colesten-3 β -ol-7-ona (entre 0,001 y 1 mg/mL). El área de cada pico se utilizó como señal analítica. Los COPs identificados fueron considerados como descriptores químicos.

Con el fin de estudiar la recuperación y reproducibilidad del método, los resultados se compararon con los obtenidos a partir de concentraciones conocidas de COPs en la matriz grasa (ocho réplicas realizadas en diferentes días).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.8.1 Microbiología

Las ecuaciones de regresión, los coeficientes de determinación (R^2) y las barras de error de los parámetros termomicrobiológicos se calcularon mediante Excel (Microsoft, Redmond, WA, EEUU).

3.8.2 Características físico-químicas

El análisis estadístico de las propiedades físico-químicas del lomo de cerdo fresco y adobado (a_w , pH, humedad, cenizas, extracto seco, capacidad de retención de agua, color, y textura), así como el estudio del efecto de los factores que influyen en el tratamiento con electrones acelerados (dosis aplicada) y en las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura), se realizaron con el programa informático Statgraphics Plus 5.0 para Windows. Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los resultados y se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar las variaciones entre las medias obtenidas. Para determinar si los lotes presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) se realizó el test de Rango Múltiple de Duncan.

3.8.3 Análisis sensorial

Los resultados obtenidos en la prueba triangular se interpretaron de acuerdo con las tablas del número mínimo de jueces con respuesta correcta para establecer significancia a varios niveles de probabilidad para pruebas triangulares, recogidas en Pedredo y Pangborn (1989).

El nivel de significancia de los datos obtenidos en la prueba de ordenación se estableció mediante la suma de puntuaciones de Friedman de acuerdo al modelo de Joanes (1985) y las tablas de valor crítico propuestas por Christensen y col. (2006).

3.8.4 Análisis del contenido de fosfolípidos, COPs y compuestos volátiles

Para el tratamiento estadístico de los datos resultantes del análisis de fosfolípidos y de los compuestos volátiles, se emplearon técnicas no paramétricas debido a la ausencia de normalidad en la distribución de los datos. La prueba de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors se utilizó para evaluar la normalidad de cada variable, la de Kruskal-Wallis (ANOVA monofactorial), para determinar diferencias significativas entre tres niveles de cada una de las variables y la de Mann-Whitney, para determinar las diferencias entre dos niveles de una misma variable. Esta prueba se considera similar a la t de Student para muestras de grupos independientes. Para el análisis estadístico de los COPs, se empleó la técnica de reconocimiento de patrones, incluyendo el análisis de componentes principales y el análisis discriminante lineal.

Los cálculos del análisis de fosfolípidos, de los compuestos volátiles y de los COPs se realizaron utilizando el paquete estadístico CSS: STATISTICA de StatsoftTM (Tulsa, OK, EEUU).

4 RESULTADOS

ARTÍCULO 1

Effect of E-beam on the shelf-life extension and safety of whole fresh pork loin

Journal of Food Protection. 2012. 75(12): 2179-2189

Shelf-Life Extension and Sanitation of Fresh Pork Loin by E-Beam Treatment

IRENE GARCÍA-MÁRQUEZ, MARÍA I. CAMBERO,* JUAN A. ORDÓÑEZ, AND MARÍA C. CABEZA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

MS 12-217: Received 16 May 2012/Accepted 16 July 2012

ABSTRACT

The usefulness of electron beam (E-beam) irradiation to increase the shelf life of whole fresh pork loin stored at 4°C has been studied. The shelf life was extended from 5 to 11 and 20 days after the application of 1 and 2 kGy, respectively. If a temperature abuse situation were to occur during product distribution (e.g., increase to 8°C), the shelf life would be extended from 3 to 8 and 15 days, respectively, after application of the same doses. When considering *Listeria monocytogenes* from a public health point of view, the irradiated whole fresh loin may be marketable for periods longer than 2 weeks, thus guaranteeing a practically *Listeria*-free product. Irradiation produced no important changes in the rheological characteristics of the meat. Although the sensory quality of irradiated meat was scored lower than the control immediately after irradiation, after 5 days in storage, irradiated meat scored higher than or not different from the control.

The loin (*longissimus dorsi*) is perhaps the highest quality piece of meat from the pig carcass. The whole loin wrapped in laminated film bags of low gas permeability is often distributed under refrigeration to retailers and large supermarkets, where family portions are prepared from it, usually slices, to be cooked at home by consumers. Because of its nutrients, pH (about 5.5), and water activity (0.99), the loin has a very short shelf life and does not last any longer than 5 to 7 days under refrigeration. Spoilage follows the pattern of fresh meat and is commonly due to the growth of the slime-producing psychrotrophic gram-negative aerobic microbiota, mainly *Pseudomonas* spp. (26). Any action applied to increase the shelf life of this product would be very useful from a commercial point of view. Several approaches may be taken to reach this goal. The most effective one is freezing, because frozen meat may be stored for many months. However, freezing causes a significant loss of quality that primarily affects the texture and the water holding capacity (WHC). Frozen meat is not well accepted by the consumer and undergoes considerable devaluation. Another less aggressive preservation method is packaging the meat in a CO₂-enriched atmosphere (11, 24, 69). The most common spoilage aerobic gram-negative bacteria (mainly *Pseudomonas* spp.) are effectively inhibited by the CO₂ (21) and are replaced by CO₂-resistant organisms, e.g., lactic acid bacteria (LAB) and *Brochothrix thermosphacta* (11, 66). In this modified atmosphere, myoglobin becomes the limiting factor in the shelf life, and the use of CO₂- and O₂-enriched atmospheres delays metmyoglobin formation (11). However, concerns have

been expressed (22, 54) that the increase in the shelf life of meat packaged in modified atmospheres through inhibition of spoilage bacteria may provide sufficient time for human pathogens to grow to dangerous levels while the food remains attractive to the consumer. In this context, *Listeria monocytogenes* is the organism of most concern because of its ubiquity, psychrotrophic character, and facultative anaerobic ability. This bacterium is inhibited by CO₂ at very high concentrations, i.e., 75 to 100% (36), but at a concentration of 50% the CO₂ is less inhibitory (32). The risk may be increased by the potential growth of food-borne pathogens under conditions of temperature abuse by retailers and consumers (70), which unfortunately occurs frequently. A third strategy is the combined application of several preservation methods according to the hurdle model (53), but many inhibitory factors must be precisely controlled.

In this work, treatment with electron beam (E-beam) radiation is proposed as a pork preservative. Several authors (18–20, 23) have reported that irradiation is an effective method for killing pathogenic bacteria and decreasing the number of spoilage microorganisms.

Yersinia enterocolitica also is prevalent in pork and pork products. It is a facultative anaerobe that can grow at 4°C on fresh pork chops, and its growth rate is enhanced under CO₂-enriched conditions, where it can reach very high populations within 35 days of storage. Thus, the presence of this pathogen on fresh meat can present a microbiological risk when stored under modified atmospheres (77). However, *Y. enterocolitica* has not been used in irradiation experiments because its resistance to irradiation is much lower than that of *L. monocytogenes*, e.g., 0.1 to 0.2 kGy (31, 47) versus 0.35 to 0.5 kGy (18, 20).

* Author for correspondence. Tel: +34 913943744; Fax: +34 913943743; E-mail: icambero@vet.ucm.es.

Similarly, *Salmonella* Enteritidis is also of concern; its ability to multiply in fresh pork loin and cause illness has been clearly documented (9). This bacterium is not able to grow at refrigeration temperatures nor is the risk as high under conditions of temperature abuse occurs compared with that of *L. monocytogenes*. Several authors (19, 57, 58) have reported higher generation times for *Salmonella* than for *L. monocytogenes*, e.g., 14 h versus 7 h in cooked ham at 10°C, respectively (19).

Therefore, whichever treatment is used to eliminate *L. monocytogenes* to reach a food safety objective will be adequate to reduce the *Yersinia* and *Salmonella* to the lowest levels at the end of the shelf life. To attain this goal, experiments were conducted to optimize E-beam treatments to find a compromise for achieving an acceptable shelf-life extension and adequate microbial safety.

MATERIALS AND METHODS

Organisms. As a surrogate for *L. monocytogenes*, *L. innocua* NCTC 11288 was used. Fresh cultures were prepared for each experiment by removing a piece of frozen culture (−40°C in Trypticase soy broth with 10% glycerol) from vials, inoculating it into 9 ml of Trypticase soy broth, and incubating it at 32°C for 24 h. The culture was then centrifuged at 4°C, and the pellet was suspended in a sterile test tube with 10 ml of sterile saline, which yielded a bacterial level close to 10⁸ CFU/ml. The handling, subculture, and inoculum preparation for *L. innocua* and sample contamination have been previously described (18, 20). In all experiments, a large number of cells were used to precisely calculate the radioresistant parameters.

Sample preparation and irradiation treatment. Twenty-four hours postmortem, whole loin pieces (3.5 to 5 kg in weight) were purchased at a local market, divided into samples (about 500 g), and packaged in laminated film bags of low gas permeability (diffusion coefficient of 35 cm³/24 h/m² bar for O₂ and 150 cm³/24 h/m² bar for CO₂). Samples were then transported to the irradiation plant (Tarancón, Cuenca, Spain, 60 km from the laboratory) in refrigerated boxes. At the plant, samples were treated with an industrial E-beam radiation source, which operates at 10 MeV. The system included a device for turning over the samples to irradiate them on both sides. The radiation doses used were between 0.2 and 3 kGy. The dose absorbed by samples was verified with cellulose triacetate dosimeters (7) simultaneously irradiated. To determine the radioresistance of *L. innocua*, a portion of fresh loin was cut into slices of about 0.5 cm thick with an electric machine, whose rotating blade and contact surfaces were previously deeply cleaned. The slices were inoculated as previously reported (20). Experiments were performed at room temperature (18 to 20°C) in triplicate. The temperature increase during treatment was less than 2°C. After treatment, samples were stored at 4 and 8°C; samples stored at the latter temperature represented a temperature abuse scenario during product distribution.

Microbial analysis. To enumerate survivors, about 1 g of treated sample was homogenized with 10 ml of a sterile saline solution in a stomacher bag. Superficial indigenous microbiota were enumerated by aerobic plate counts (APCs) using the pour-plate method with plate count agar (Difco, BD, Sparks, MD) plus 2% NaCl (55) as the culture medium. LAB were counted in double-layer de Man Rogosa Sharpe agar (Conda-Pronadisa, Madrid, Spain)

at pH 5.6 (55). Samples were incubated at 32°C for 48 h. *Enterobacteriaceae* were enumerated on violet red bile glucose agar (Oxoid, Basingstoke, UK) after incubation for 24 h at 37°C. *Pseudomonas* spp. were determined after incubation for 48 h at 25°C on *Pseudomonas* agar base supplemented with cetrimide, fucidin, and cephalosporin (Oxoid). Palcam medium (Oxoid) was chosen for *Listeria* spp. to enumerate survivors (at 37°C for 48 h) and to avoid the growth of endogenous microbiota. Colonies were enumerated with a Digital S colony counter (J.P. Selecta, Barcelona, Spain). The growth curves were constructed according to the Baranyi and Roberts model (13).

The shelf life of pork loin was determined by periodically counting the surface bacterial flora. Nonirradiated samples were used as controls. From a microbiological point of view, the end of shelf life was established when the APC exceeded 5 × 10⁷ CFU/cm². Analyses were performed just after E-beam treatment (0 days) and during storage until the end of the shelf life.

Physicochemical characteristics. The dry matter (oven air-drying method) was analyzed following AOAC (10) procedures. The pH of the meat was determined in a homogenate of loin with distilled water (1:10, wt/vol) with a Digit-501 pH meter (Crison Instruments Ltd., Barcelona, Spain). The a_w was measured at 25°C with a CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA).

The WHC was measured with the Carver press method (48). A meat sample (0.3 g) was placed on a piece of filter paper (Whatman No. 1, 125 mm; Whatman, Clifton, NJ), set between two Plexiglas plates, and pressed with a mechanical force of 345 kPa for 5 min. The WHC was calculated as the percentage of water retained based on water content in the product before pressing. Four replicate measurements were recorded for each sample.

The exudate loss in raw samples treated at 0, 1, and 2 kGy was determined according to the method of Honikel (42). Pork loin samples (about 25 to 35 g) were packed in bags and treated by E-beam irradiation under the above conditions. For the drip determination, the meat samples were removed from the bags, placed in a perforated support, and then suspended in an inflated bag, ensuring that the sample did not make contact with the bag. After 12 h at 4°C, samples were weighed. Drip loss was expressed as a percentage of the initial weight.

Steaks (2 cm thick) from nontreated and treated pork loin were used to determine the cooking loss according to the method of Aaslyng et al. (1). Samples were heated on a grill pan at a temperature of 160°C. The steaks were turned every 30 s, and the temperature was determined at the center of each steak with a handheld probe (model 735, Testo, S.A., Barcelona, Spain). The steaks were removed from the pan when the temperature reached 70°C. Steaks were weighed before and after cooking to determine cooking losses (expressed as a percentage of the initial sample weight).

WHC, pH, a_w, and drip and cooking loss were determined immediately after E-beam treatment (0 days) and 5 days after treatment during storage at 4°C.

Texture measurements. The texture profile analysis (TPA) and tensile test were carried out with a TA.XT2i SMS texture analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Goldaming, UK) using a cylindrical probe P/25 for TPA and a tensile grip (A/TGT) for the tensile test. Both tests were performed as previously described (41). The TPA was determined in cylinders (1.5 cm high by 2 cm wide). The tensile test was performed on rectangular pieces (7.5 cm long, 2 cm wide, and 0.3 cm thick) of raw pork loin. Measurements

TABLE 1. Effect of E-beam treatment on pH, water activity (a_w), water holding capacity (WHC), cooking loss, and drip loss of raw pork loin after 0 and 5 days of storage at 4 °C^a

Measurement	Storage time (days)	Dose (kGy):		
		0	1	2
pH	0	5.55 ± 0.04	5.57 ± 0.03	5.49 ± 0.06
	5	5.61 ± 0.05	5.52 ± 0.06	5.54 ± 0.06
a_w	0	0.989 ± 0.001 A	0.987 ± 0.002 A	0.986 ± 0.002
	5	0.984 ± 0.001 B	0.983 ± 0.001 B	0.984 ± 0.001
WHC (%)	0	32.76 ± 4.17 B a	30.99 ± 2.82 B ab	28.53 ± 1.40 B b
	5	52.75 ± 2.15 A a	52.11 ± 3.97 A ab	46.94 ± 1.56 A b
Cooking loss (%)	0	31.23 ± 2.65	31.69 ± 1.37	30.77 ± 3.12
	5	32.78 ± 2.17	30.49 ± 3.70	29.59 ± 4.26
Drip loss (%)	0	2.72 ± 1.47 b	4.73 ± 1.09 b	7.24 ± 1.89 a
	5	3.04 ± 1.11 b	3.19 ± 1.70 b	9.74 ± 2.10 a

^a Values are means ± standard deviations. Within a row, means with different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$). Within a column for the same physicochemical characteristics, means with different uppercase letters are significantly different ($P < 0.05$).

were recorded 0, 5, and 10 days after E-beam treatment during storage at 4 and 8 °C.

Color measurements. Color measurements were made with a tristimulus colorimeter (Chroma Meter CR300, Minolta Corporation, Wayne, NJ). The L^* (lightness), a^* (redness), and b^* (yellowness) values were measured six times on the surface of the samples at three analysis times: 0, 4, and 24 h after opening the packages and exposing the contents to air. After the first color measurement, samples were kept at $6 \pm 2^\circ\text{C}$ and $64\% \pm 2\%$ relative humidity without protection (similar to conditions in a refrigerated display case or a domestic refrigerator). Color parameters were determined in nontreated and treated samples at 0, 5, and 10 days of storage at 4 °C.

Sensory analysis. The sensory analyses were performed by 20 tasters selected from the Department of Nutrition, Food Science and Food Technology (Complutense University of Madrid). Triangular, rank order, and descriptive tests were performed as previously described (14). Analyses were carried out in individual booths built according to the International Organization for Standardization (45) DP 66.58 criteria. For the flavor analysis, pork loin steaks (0.5 cm thick) were cooked for 2 min on each side in a grill pan previously heated to 150 °C. The temperature inside the steaks reached approximately 70 °C, as measured with a portable digital thermometer (model 735, Testo). This treatment was sufficient to obtain an adequate final degree of doneness. The appearance and odor were evaluated in raw and cooked samples. Only samples stored at 4 °C were used for sensory analysis. The range order test was performed until the end of the shelf life of nontreated samples. Triangular and descriptive tests were performed until the end of the shelf life of the nontreated and treated samples.

Statistical analysis. Survival curves were obtained by plotting the logarithm of the number of survivors against the radiation dose assayed. Decimal reduction doses (D -values) were calculated from the linear regression equation of survival curves. Regression equations, coefficients of determination (R^2), and the error bars were calculated with Excel (Microsoft, Redmond, WA). For data from the physicochemical analysis, the differences among means were established by an analysis of variance (ANOVA) and Duncan’s multiple comparison procedure. The effects of the individual variables associated with E-beam treatment and storage

(dose and time and temperature of storage) and their interactions were analyzed with a multivariable ANOVA. These statistical analyses were performed using the Statgraphics Plus 5.0 program (Statpoint Technologies, Warrenton, VA).

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characteristics. The fresh pork loin used in this research had a dry matter content of $27.3\% \pm 1.6\%$. The effect of E-beam irradiation (1 and 2 kGy) on selected properties (pH, a_w , WHC, and cooking and drip loss) of the fresh product is recorded in Table 1. Significant differences were not observed for pH values ($P > 0.05$). This confirmed observations by several authors who reported that the pH of pork loin is not affected by irradiation treatment at 2 to 3 kGy (4, 51). A significant effect ($P < 0.05$) of the E-beam treatment was a decrease in WHC, which in turn could explain the increase in the drip loss in samples irradiated at 2 kGy. Other authors (51, 82) have also reported a decrease in WHC and an increase in soluble protein and exudates loss in irradiated pork *longissimus dorsi* muscle. These effects may be associated with changes produced by radiation on the muscle tissue structure, e.g., shrinkage of the myofibrils, as observed by Yoon (81) in chicken breast irradiated at 2.9 kGy. Although a significant increase ($P < 0.05$) in drip loss (7 to 8% in irradiated loin versus 2 to 4% in the control) was found in the samples treated at 2 kGy, the a_w value remained unchanged ($P > 0.05$). This finding could be explained by the general sorption isotherm of high-moisture foods (34), which predicts that at a_w values of 0.94 to 0.99 a large water loss is required to detect a minor decrease in the a_w value. The amount of fluid lost by leakage in these loin samples was not enough to cause a detectable reduction of the a_w . For cooking loss, no significant differences ($P > 0.05$) were observed between control and irradiated samples, probably because the dose was too low. Bowes and Moss (15) reported changes in the collagen fibers in response to radiation at 5 and 50 Mrad (50 and 500 kGy).

Shelf-life aspects. To explore the effect of irradiation treatment on loin shelf life, the fate of the indigenous

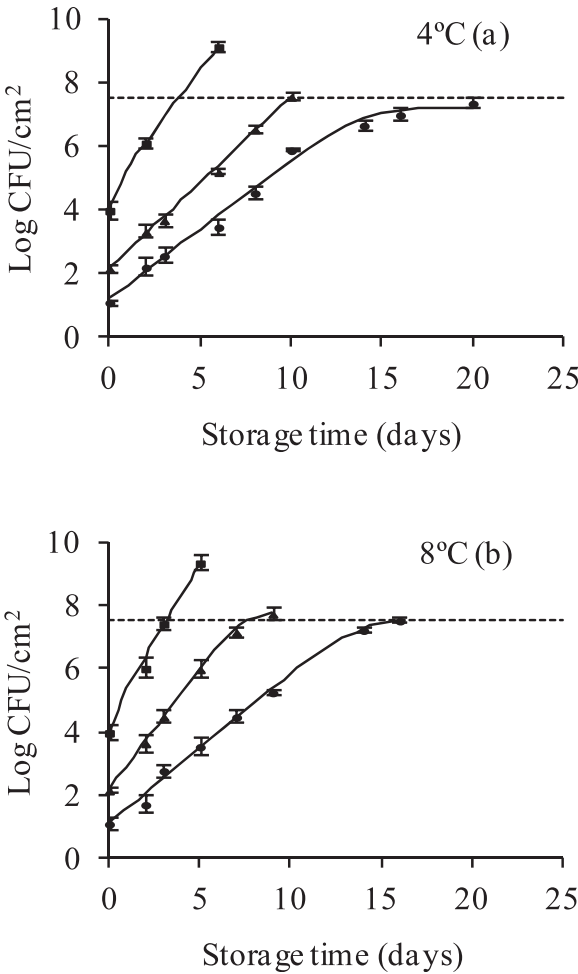


FIGURE 1. Changes in aerobic plate counts (APCs) of control fresh pork loin samples (■) and samples irradiated at 1 (▲) and 2 (●) kGy and then stored at 4°C (a) and 8°C (b). The dotted line indicates the end of the shelf life.

microbiota on the fresh pork loin after irradiation was studied. Figure 1 shows the changes in APCs in nontreated (control) and E-beam-treated (1 and 2 kGy) fresh loin samples during storage at 4 and 8°C.

The superficial indigenous microbiota of loin stored at 4°C (Fig. 1a) accounted for 4.0 log CFU/cm² in nontreated samples, and after treatment at 1 and 2 kGy decreases of about 2.0 and 3.6 log CFU/cm², respectively, were observed. From these data, a *D*-value of 0.61 kGy was roughly estimated. This value is in the range usually reported for vegetative bacteria, which is close to the *D*-value of LAB (67, 80), enterococci (2), and the pathogens *Staphylococcus aureus* (19, 39), *Salmonella* (2, 20, 39), and *L. monocytogenes* (18, 61) but higher than the *D*-value of other pathogens such as *Y. enterocolitica* and many gram-negative bacteria, for which *D*-values of 0.2 to 0.3 kGy have been commonly reported (31, 47).

The initial APC in the fresh product (4.0 log CFU/cm²) can be considered a usual bacterial load, and the meat could be judged as acceptable in terms of microbiological quality (29). At 4°C, the shelf life of control samples (when the APC reached the value of 7.5 log CFU/cm²) was about 5 days. A doubling time (*g*-value) of 10.3 h was roughly

estimated, similar to that reported by other authors (8). Findings were similar when samples were stored at 8°C, but the *g*-value decreased significantly (6.2 h). The E-beam treatment at 1 kGy resulted in a decrease in the original bacterial load, leading to a significant increase in shelf life at 4°C; 7.5 log CFU/cm² was reached only after 11 days, with an estimated *g*-value of 14.8 h (0.25-fold higher than that of the nonirradiated microbiota), i.e., the growth rate of the microbiota was decreased by the E-beam treatment. The same effect was previously observed for *S. aureus* and *L. monocytogenes* in cooked ham (19) and for LAB in cheese (80), which was attributed to repair of damage caused by radiation. Therefore, the shelf-life extension of the products is due to both the lethal effect of the E-beam radiation and the decrease in the growth rate of the surviving indigenous microbiota. When a dose of 2 kGy was applied, the shelf life at 4°C was extended to around 18 to 20 days, with a rough *g*-value of 19 h, which is enough for safe domestic and large-scale distribution of fresh pork loin under refrigeration (4°C). Therefore, results obtained in the present study indicate that E-beam irradiation, even at low doses, is a useful strategy for extending by either twofold (1-kGy treatment) or fourfold (2-kGy treatment) the shelf life of fresh pork loin (and presumably other pork cuts).

During meat handling and transportation (mainly for long distances) under refrigerated conditions, temperature abuse may occur (e.g., 8°C) for a variable period of time, which may promote the growth of any organisms present on the meat. Figure 1b shows the changes in the APCs of nontreated and E-beam-treated (1 and 2 kGy) fresh loin stored at 8°C. An acceleration of the growth rate of the indigenous bacteria was observed. Accordingly, the estimated shelf life was 3, 8, and 15 days at doses of 0, 1, and 2 kGy, respectively. From the curves, *g*-values of 6.2, 9.4, and 15.6 h were calculated, respectively. Similar results have been reported by other authors (19, 38, 60). Although these findings indicate that meat stored at 8°C is acceptable for consumption for a shorter period of time than is that stored at 4°C, the E-beam irradiation extended the shelf life of fresh meat even after temperature abuse; shelf lives for treated samples were close to threefold (at 1 kGy) and fivefold (at 2 kGy) longer than those for the nontreated samples.

The initial LAB level in the nontreated loin samples was about 1.5 log CFU/cm² (Fig. 2). Just after E-beam treatment at 1 kGy, the level decreased approximately 1 log CFU/cm² (0.5 log CFU/cm² was recorded), and at 2 kGy the level was below the detection limit (<100 CFU/cm²) of the method, although LAB were detectable later. At 4°C (Fig. 2a), 11, 12, and 15 h were estimated for the *g*-values in the control samples and those treated with 1 and 2 kGy, respectively. These values were slightly lower when samples were stored at 8°C (Fig. 2b): 10, 11, and 13 h, respectively. After 20 days of storage, LAB had not reached the critical level of 5×10^7 log CFU/cm², and they represented less than 1% of the APC, i.e., LAB were not the main microbiota responsible for the meat spoilage.

For pseudomonads, the original level in control samples was 2.5 log CFU/cm² (approximately 3% of APC).

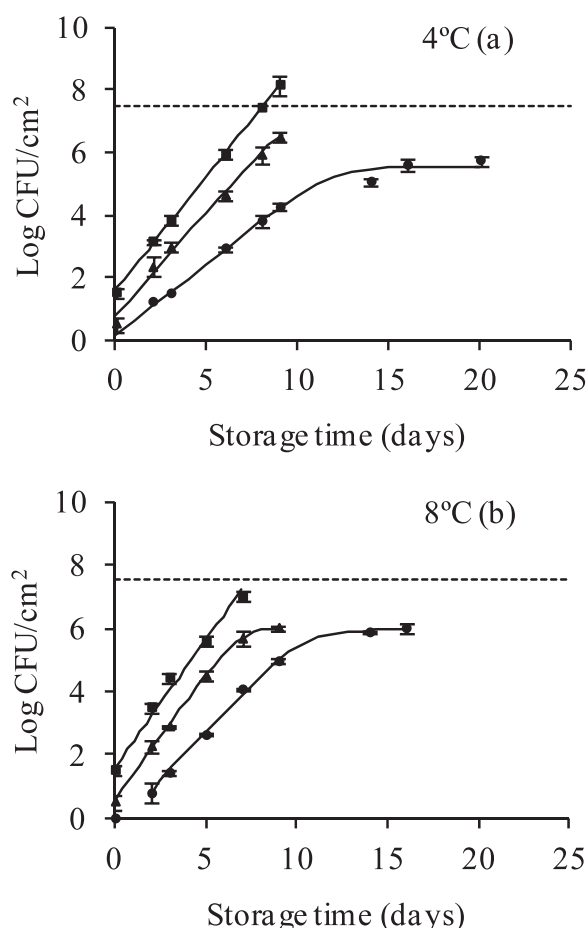


FIGURE 2. Behavior of lactic acid bacteria (LAB) in control fresh pork loin samples (■) and samples irradiated at 1 (▲) and 2 kGy (●) and then stored at 4°C (a) and 8°C (b). The dotted line indicates the end of the shelf life.

However, after 5 days the level was practically the same as the APC. When fresh meat with normal pH (e.g., 5.6) is placed in storage under refrigeration, the pseudomonads begin to grow. Under normal circumstances, enough glucose and other carbohydrates are present to support about 10^8 CFU/cm² (35). Among the heterogeneous fresh meat microbiota, the organisms with the fastest growth rates and that can utilize glucose are the aerobic gram-negative pseudomonads (35). In the present study, these organisms were responsible for the spoilage observed, although at the beginning they represented a minor percentage of the APC. This finding agrees with those of several authors (25, 62). Morgan et al. (62) reported that *Pseudomonas* spp. accounted for up to 90% of the microbiota when the meat became spoiled during refrigerated storage.

Pseudomonads were not detected in samples that had been treated with E-beam radiation at 1 and 2 kGy until these sample had been stored for several days at either 4 or 8°C, i.e., the levels were lower than 100 CFU/cm². The pattern for APC counts for nontreated samples was similar to that observed for treated samples (Fig. 1). However, the pseudomonads in treated samples at both doses were unable to grow at the same rate. At 4°C, they were able to reach only about 6 log CFU/cm². This low growth may be related

to the selective culture medium used to inhibit the growth of other organisms present in the samples or to the culture medium used for enumeration of survivors, which was supplemented with cetrимide, fucidin, and cephalosporin as inhibitors of native microflora. The E-beam irradiation may have sensitized the pseudomonads, which then may have been inhibited by the supplemental antimicrobials. At 4°C, the temperature may act as an additional disgenic agent. Therefore, the actual count is not reflected by that obtained on the pseudomonad-selective medium but rather by the APC reported in Figure 1.

Pseudomonad generation times of 6.6, 10.8, and 17.6 h were calculated for samples treated at 0, 1, and 2 kGy, respectively, and stored at 4°C. When the pork loin was stored under temperature abuse conditions (8°C), the generation times calculated were 4.56, 10.6, and 16.0 h at 0, 1, and 2 kGy, respectively. Pseudomonads are very sensitive to irradiation, e.g., *D*-values of 0.08 and 0.13 kGy have been reported for *Pseudomonas putida* (71) and *Pseudomonas* spp. (59). These values suggest that in a mixed microbiota, such as that of fresh meat, the most radiosensitive bacteria will be effectively killed, which explains the response of the pseudomonads. The most radioresistant organisms will survive, but they may not necessarily cause spoilage; these survivors may either grow more slowly than the radiosensitive organisms or they may not be able to compete at refrigeration temperatures.

B. thermosphacta and cold-tolerant *Enterobacteriaceae* also can be found in aerobically stored meat, but because of their slower growth rate they are poor competitors for the pseudomonads (25, 35, 52). In the present study, at the end of the loin shelf life *Enterobacteriaceae* levels reached 4 and 5 log CFU/cm² at 4 and 8°C, respectively, in nontreated fresh loin samples (controls). In irradiated samples, counts were lower than the detection limit during the entire storage time at both temperatures.

Food safety aspects. As expected, the response of *L. innocua* (surrogate for *L. monocytogenes*) to the irradiation treatment fitted first-order inactivation kinetics, according to the following regression equation: $\log \text{CFU/cm}^2 = 7.67 - 2.31 \times \text{dose}$ ($R^2 = 0.9955$). From this equation, a *D*-value of 0.43 kGy was calculated, slightly lower than the 0.49 kGy determined for the same *L. innocua* strain in cooked ham (18). This difference is to be considered normal because evidence suggests that bacterial radioresistance may be influenced by the food matrix (12, 68). The 0.43 kGy value also falls within the range previously reported for different *Listeria* strains in various foods and under various conditions (39, 74).

Among non-spore-forming pathogens, *L. monocytogenes* is one of the most radioresistant (30, 40, 43, 61). The extended shelf life of the pork loin resulting from the E-beam treatment may provide an opportunity for *L. monocytogenes* to grow because of its psychrotrophic nature, thereby increasing the product risk when consumed. Thus, the potential for an increase in *L. monocytogenes* levels during the storage period must be considered. In the U.S. Food and Drug Administration report (79), several

TABLE 2. Effect of several variables on breaking strength and texture profile of fresh pork loin

ANOVA	Breaking strength (N/cm ²)	Hardness (N)	Adhesiveness (N·s)	Cohesiveness	Springiness (× 10 ⁻² ; m)	Chewiness (J)
Main effect (<i>F</i> ratio) ^a						
E-beam treatment (A)	0.72 NS	1.36 NS	2.42 NS	3.85*	0.84 NS	4.17*
Storage time (B)	3.29 NS	0.63 NS	13.21**	0.98 NS	17.7***	9.47**
Storage temp (C)	0.24 NS	9.64**	1.38 NS	1.53 NS	6.07*	0.69 NS
Interaction (<i>F</i> ratio) ^a						
A vs B	0.11 NS	0.52 NS	2.66 NS	0.32 NS	1.55 NS	3.04 NS
A vs C	0.59 NS	0.36*	0.04 NS	0.31 NS	1.00 NS	2.18 NS
B vs C	0.01 NS	11.94**	1.38 NS	1.34 NS	7.57*	0.89 NS
A vs B vs C	0.76 NS	0.36 NS	0.04 NS	0.31 NS	1.00 NS	2.18 NS
Irradiation dose effects ^b						
0 kGy	3.63 ± 0.35 A	31.44 ± 5.57 A	-0.57 ± 0.13 A	0.50 ± 0.30 AB	0.20 ± 0.50 A	0.029 ± 0.50 A
1 kGy	3.92 ± 0.42 A	25.47 ± 6.11 A	-0.46 ± 0.80 A	0.45 ± 0.40 B	0.21 ± 0.70 A	0.021 ± 0.50 B
2 kGy	3.74 ± 0.40 A	28.01 ± 7.20 A	-0.47 ± 0.70 A	0.51 ± 0.40 A	0.17 ± 0.40 A	0.023 ± 0.50 AB

^a Significance: NS, not significant ($P > 0.05$); * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$.
^b Values are means ± standard deviations for breaking strength and texture attributes. Within a column, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

authors provided evidence of increased *L. monocytogenes* levels in various products, with an average increase of 0.2 log units per day in fresh meat stored at 4 to 5°C and 0.35 log units per day in meat stored at 8°C (19, 79). Assuming contamination of the fresh loin at 10 cells per cm² (1 log CFU/cm²), as suggested by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (44), the *L. monocytogenes* population in nonirradiated loin would be about 10² CFU/cm² at both 4°C (shelf life of 5 days) and 8°C (shelf life of 3 days). These values do not meet either the microbiological criterion for *L. monocytogenes* of 100 CFU/cm² stipulated by the European Union or the zero-tolerance policy of the U.S. Department of Agriculture. Nevertheless, E-beam treatment provokes 2.33 *D* and 4.65 *D* reductions with the application of 1 and 2 kGy, respectively. Therefore, the E-beam treatment would reduce the level of *Listeria* to 4.7 × 10⁻² and 2.2 × 10⁻⁴ CFU/cm², respectively. Because this bacterium is able to grow under refrigeration conditions, levels would increase during storage in such a way that, assuming the same growth rate, they would be around 8 and 2 CFU/cm², respectively, at the end of the shelf life at 4°C (18 to 20 days), lower than the 100 CFU/cm² criterion but very far from the zero-tolerance criterion (absence in 25 g). In cooked ham, the growth of *Listeria* that survived the E-beam treatment was significantly reduced because of increases in both the lag phase and the *g*-value (19). For example, when 2 kGy was applied, the lag phase of the surviving population at 7°C was about 5 days and the *g*-value increased from 25 h (nontreated cells) to 125 h. Therefore, the level of *Listeria* at the end of the product shelf life, even under temperature abuse conditions, probably will be lower than the microbiological limit stipulated by the regulatory agencies, and in general consumer health should be safeguarded and cross-contamination minimized. Temperature abuse usually does not occur during the entire shelf life; usually the temperature rises only occasionally. However, under the worst-case

scenario, in which temperature abuse (8°C) occurs during the entire storage period, a calculation similar to that for storage at 4°C would yield about 30 CFU/cm² at the end of the storage period (shelf life of 8 days) when a 1-kGy radiation treatment is applied and 40 CFU/cm² at the end of the storage period (shelf life 15 days) when a 2-kGy treatment is used. Therefore, the results obtained for products stored at 4°C in relation to the microbiological limit criteria also are valid for products stored at 8°C.

Texture and breaking strength analyses. Table 2 shows the effect of E-beam treatment and storage (time and temperature) on selected rheological characteristics of fresh pork loin. The multifactor ANOVA results indicated that only cohesiveness and chewiness were significantly affected ($P < 0.05$) by E-beam treatment. The lowest values for these rheological parameters were obtained at 1 kGy (about 0.45 and 0.021 J, respectively). However, no differences ($P > 0.05$) were found in the mean breaking strength (3.76 N/cm²), hardness (28 N), adhesiveness (-0.5 N·s), and springiness (0.19 × 10⁻² m). These results indicate that doses higher 2 kGy would be needed to produce considerable changes in the rheological features of meat. In other studies (50, 73), doses higher than 10 kGy resulted in myofibril fragmentation and a decrease in tensile strength of muscles. Changes in secondary and tertiary structures of protein and induced cross-binding also have been found at higher doses (78). However, no marked difference was reported in the texture of fresh pork loins (raw and cooked) treated at 6 kGy (49).

Unlike E-beam treatment, a significant effect of sample storage parameters (time and temperature) on the TPA parameters (except cohesiveness) was observed (Table 2). The storage time significantly affected the adhesiveness ($P < 0.005$) and the chewiness ($P < 0.005$). In general, adhesiveness and chewiness increased with an increase in storage time ($P < 0.005$), which is probably related to the

TABLE 3. Effect of several variables on redness (*a**), yellowness (*b**), and reflectance (*L**) of fresh pork loin

ANOVA	<i>a</i> *		<i>b</i> *		<i>L</i> *	
	<i>F</i> ratio	<i>P</i>	<i>F</i> ratio	<i>P</i>	<i>F</i> ratio	<i>P</i>
Main effect ^a						
E-beam treatment (A)	31.46	0.0000	15.57	0.0000	48.53	0.0000
Air exposure time (B)	10.09	0.0001	51.33	0.0000	64.29	0.0000
Storage time (C)	16.90	0.0000	52.23	0.0000	15.82	0.0000
Interaction ^a						
A vs B	1.48	0.2010	1.67	0.1600	1.14	0.3400
A vs C	4.45	0.0018	21.42	0.0000	8.74	0.0000
B vs C	1.35	0.2500	1.98	0.1000	3.13	0.0200
A vs B vs C	2.30	0.0200	1.78	0.1000	3.37	0.0010
Irradiation dose effects ^b						
0 kGy	7.90 ± 0.28 A		6.39 ± 0.35 B		53.87 ± 0.83 c	
1 kGy	6.49 ± 0.29 B		8.29 ± 0.65 A		55.48 ± 0.87 B	
2 kGy	6.47 ± 0.34 B		8.05 ± 0.67 A		57.74 ± 0.77 A	

^a Values are *F* ratios and associated *P* values.
^b Values are means ± standard deviations for *a**, *b**, and *L**. Within a column, means with different letters are significantly different (*P* < 0.0001).

formation of slime by gram-negative bacteria, e.g., pseudomonads, after the count exceeded 10⁸ CFU/cm² (26, 35). The springiness also was significantly affected (*P* < 0.0005) by storage time, although it depended on the storage temperature; a significant interaction (*P* < 0.05) between both storage factors was found. Springiness increased (*P* < 0.05) only as the storage time increased when the temperature was 8°C. For hardness, a significant effect (*P* < 0.005) of storage temperature was found. Significant interactions between storage variables (*P* < 0.005) and between storage temperature and E-beam treatment (*P* < 0.05) also were found. This latter interaction indicated that the effect of the E-beam treatment on the hardness is dependent on storage temperature. This interaction explains the lower hardness values (*P* < 0.05) found for the treated samples stored at 8°C, whereas no significant differences (*P* > 0.05) were observed between nontreated and treated samples stored at 4°C. The minimum hardness (13.74 N) was found at the end of the shelf life of the products treated at 2 kGy and stored at 8°C. This result is an accordance with previous reports of the acceleration of a number of enzymatic and chemical reactions (76, 82) during temperature abuse and fluctuation during meat storage. No additional interactions were found between storage variables and E-beam treatment (Table 2). Therefore, E-beam treatment had less of an effect on the rheological parameters than did the storage conditions (temperature and time).

Color. Significant effects (*P* < 0.0001) of E-beam treatment, air exposure time (0, 4, and 24 h), and storage time were detected for *a**, *b**, and *L** values (Table 3). The loin E-beam treated samples had lower *a** and higher *b** and *L** values than did the nontreated samples (Table 3). These results are in agreement with the color changes observed by other authors (63, 64) in meat and meat products after irradiation. Irradiation reduced the redness (*a**) of ground

beef significantly (63). The color changes induced by irradiation differ depending on animal species, muscle type, meat product, dose, and packaging type (16). An important role has been attributed to the meat pH and the concentration and state of myoglobin (56, 72). Some authors have speculated (37) that free myoglobin binding sites could react with free radicals such as hydroxyl or sulfuryl produced by radiation of metmyoglobin and sulfmyoglobin. When the myoglobin is primarily in the MbFe³⁺ form, irradiation produces a pigment with a spectral curve similar to that of oxymyoglobin (72), which results in an increase in the *a** value. However, when the pigment is primarily in the MbO₂ form, the radiation converts the pigment into MbFe³⁺, thus decreasing the *a** value.

The packaging atmosphere (aerobic or anaerobic) has a greater effect on meat color than does irradiation alone (6). Tappel (75) reported that the color of pork irradiated in an oxygen atmosphere changed from pink to brown. The irradiation of aerobically packaged ground pork decreased the *a** values (less red) and increased the visual gray and brown colors (73). These statements are in total agreement with the results obtained in the present study (Table 3). Previous literature also indicates that irradiation increases the yellowness (*b**) in all species of meat (16).

In general, the *a** value decreased with increased storage time (*P* < 0.05) but increased with increasing air exposure time (*P* < 0.05). The *b** value also increased with increases of both storage and air exposure times (*P* < 0.05). An inverse reaction was observed for the *L** value, which could be related to the loss of surface water (33).

The E-beam treatment effect on the three instrumental color parameters was independent of the time that samples were exposed to air; no interactions (*P* > 0.05) between these variables were found (Table 3). However, the contribution of E-beam treatment to meat color was affected by

TABLE 4. Significant differences of appearance (A) and odor (O) of nontreated and irradiated (1 and 2 kGy) fresh pork loin in the triangular test after 0 and 5 days of storage at 4 °C

Dose (kGy)	Dose (kGy)	
	1	2
0	A ⁰ , O ⁰ O ⁵	A ⁰ , O ⁰ A ⁵ , O ⁵
1		A ⁵ , O ⁵

the storage time ($P < 0.05$). The minimum average values of a^* and the maximum b^* were obtained ($P < 0.05$) at the end of the shelf life (20 days at 4 °C) for samples treated with 2 kGy. For the a^* , significant differences between nontreated and treated samples were always detected. For b^* and L^* , significant differences ($P < 0.05$) between samples treated at 1 and 2 kGy were only found at the end of the shelf life, whereas immediately after E-beam treatment (0 days), nontreated and treated samples had similar values ($P > 0.05$). A significant interaction ($P < 0.001$) between the three variables (dose, storage time, and air exposure time) was found (Table 3) for the L^* value. At all storage times, freshly opened samples that had been treated at 2 kGy had the highest L^* values ($P < 0.05$). This result is probably associated with the lower WHC and drip loss (Table 1).

Sensory aspects. The effects of the E-beam treatments on the sensory attributes of fresh pork loin stored at 4 °C are shown in Tables 4 and 5. Significant differences in appearance ($P < 0.05$) were noted between nontreated and treated (1 and 2 kGy) samples immediately after treatment (0 days). In the descriptive subjective analyses, samples treated at 1 kGy were judged to be pale pink and those treated at 2 kGy were rated as slightly grayish pink, although they were still considered acceptable for sale. These subjective sensory results coincided perfectly with the results obtained with the color analysis instrument (Table 3). A similar trend was reported for aerobically packaged pork loin samples irradiated at 1 kGy, which were more discolored than nontreated samples (51). With the triangular test, the only significant differences ($P < 0.05$) were found after 5 days of storage for samples irradiated at 2 kGy compared with those irradiated at 0 and 1 kGy (Table 4). According to the results obtained in the descriptive subjective analyses, control samples were dark, dull, and aged and had a grayish pink color, whereas samples treated at 2 kGy were bright pink and samples treated at 1 kGy were pale pink. These appearance differences would explain the increased levels of acceptance revealed by the rank order test for treated samples (mainly those treated at 2 kGy) after 5 days of storage at 4 °C (Table 5). However, no significant differences were found between nontreated and irradiated samples, probably because the control samples had less drip loss, which undoubtedly contributed to a better sample appearance (Table 5). This result is also related to the lower WHC detected in the treated samples (Table 1). In the descriptive

TABLE 5. Sensory evaluation by rank order test of nontreated and irradiated (1 and 2 kGy) fresh pork loin

Dose (kGy)	Rank sums ^a					
	Appearance		Odor		Flavor	
	0 days	5 days	0 days	5 days	0 days	5 days
0	60 A	36	60 A	32 B	40	38
1	30 B	38	34 B	51 A	42	44
2	30 B	46	26 B	37 B	38	38

^a Sum of rank = $[(N_1 \times 1) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 3)]$, where N_1 , N_2 , and N_3 are the number of panelists that ranked the sample in the position 1 (minimum preference), 2 (intermediate preference), or 3 (maximum preference) in the ranked order test. Within a column, values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

subjective analyses conducted at the end of the shelf life of the E-beam-treated samples (11 and 20 days at 1 and 2 kGy, respectively), color features similar to those mentioned above were described. There were no significant differences ($P > 0.05$) in appearance between nontreated and treated samples after they were cooked.

For odor, significant differences ($P < 0.05$) were detected with the triangular test when nontreated and treated (1 and 2 kGy) samples were compared (Table 4). In the descriptive analyses, immediately after treatment (0 days) the samples treated at 2 kGy released a slight off-odor defined as “scalded feather,” “poultry,” and “sulfur notes.” For the samples treated at 1 kGy tasters described “less fresh” meat odor and negligible off-odor to “scalded feather” odor. More than 7% of the volatiles found in irradiated foods are hydrocarbons commonly found in heat-treated foods (65). Most chemical changes in irradiated meat are associated with free radical reactions (3). The off-odors probably were responsible for the lower scores assigned to the treated samples (Table 5) in the rank order text. Despite this effect, the irradiated samples, even those treated at 2 kGy, were considered as acceptable for sale. After 5 days of storage, samples treated at 1 kGy were given the highest ratings (Table 5). This result is consistent with those obtained in the descriptive analyses because off-odors associated with the growth of spoilage organisms and the aging of the meat (e.g., pungent, sour, and unpleasant) were detected in the nontreated samples, whereas off-odors formerly perceived in treated samples diminished with increased storage time. Several authors reported similar findings concerning the dissipation of irradiation off-odors during storage (17, 28, 63). Irradiation can increase levels of dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, *S*-methyl ester, and ethanoic acid. These sulfur compounds are highly volatile and can be eliminated by storing the irradiated meat under aerobic conditions (28). The results obtained by various researchers suggest that aerobic packaging facilitates the reduction of some of the volatile compounds responsible for irradiation odor (17, 63). Other authors reported that cooking can reduce or eliminate irradiation-induced odors (49).

In the flavor analysis of the cooked samples, no significant differences (both immediately after E-beam treatment and after storage at 4°C) were detected among samples (Table 5). In the descriptive analyses, samples treated at 2 kGy were judged less juicy and had a very slight taint of “burnt” or “hot culture medium” and a very slight astringent aftertaste. Others have reported (27) that postirradiation storage could allow flavor to return to close to that of nontreated products as the volatile compounds are lost. Much of the work on irradiated meat odor and flavor has targeted selected constituents, particularly lipids (5, 17). The reactions of sulfur-containing amino acids with water radiolytic products appear to be the source of hydrogen sulfide and other volatile sulfur-containing compounds, which contribute to off-flavors (46). Irradiation increases the concentration of 3-methylbutanal and 2-methylbutanal, mainly in vacuum-packaged samples (28). However, dimethyl disulfide levels did not differ between irradiated and nontreated samples in aerobic packages (28). A slightly higher concentration of volatile compounds has been found in irradiated cooked meat than in irradiated raw meat that was subsequently cooked (28).

The results obtained in this study indicate that the shelf life of whole fresh pork loin at 4°C may be extended from 5 to 11 or 18 to 20 days by the application of 1 or 2 kGy of E-beam radiation, respectively. Likewise, under conditions of moderate temperature abuse (8°C), the shelf life would be extended from 3 to 8 and 15 days, respectively, by the application of 1 or 2 kGy doses, without compromising the sensory qualities. From a hygienic point of view, E-beam irradiation of fresh pork loin practically guarantees a *Listeria*-free product during its shelf life, even when temperature abuse occurs, with no significant changes in the main sensory characteristics.

ACKNOWLEDGMENTS

The present work received financial support from projects AGL2010-19158 and CSD 2007-00016 (CONSOLIDER INGENIO 2010) funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation.

REFERENCES

- Aaslyng, M. D., C. Bejerholm, P. Ertbjerg, H. C. Bertram, and H. J. Andersen. 2003. Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. *Food Qual. Prefer.* 14: 277–288.
- Aguirre, J. S., M. R. Rodríguez, and G. D. García de Fernando. 2011. Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 149:236–246.
- Ahn, D. U., and E. J. Lee. 2004. Mechanisms and prevention of off-odor production and color change in irradiated meat, p. 43–76. In V. Komolprasert and K. Morehouse (ed.), *Irradiation of food and packaging: recent developments*. ACS Symposium Series 875. Oxford University Press, Oxford.
- Ahn, D. U., K. C. Nam, M. Du, and C. Jo. 2001. Volatile production in irradiated normal, pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) pork under different packaging and storage conditions. *Meat Sci.* 57:419–426.
- Ahn, D. U., D. G. Olson, C. Jo, J. Love, and S. K. Jin. 1999. Volatile production and lipid oxidation in irradiated cooked sausage related to packaging and storage. *J. Food Sci.* 64:226–229.
- Ahn, D. U., D. G. Olson, J. I. Lee, C. Jo, C. Wu, and S. Chen. 1998. Packaging and irradiation effects on lipid oxidation and volatiles in pork patties. *J. Food Sci.* 63:15–18.
- American Society for Testing and Materials. 2000. E1650-97e1 standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems. 12:2. ASTM, West Conshohocken, PA.
- Ananth, V., J. S. Dickson, D. G. Olson, and E. A. Murano. 1998. Shelf life extension, safety and quality of fresh pork loin treated with high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 61:1649–1656.
- Anonymous. 1986. Reports of outbreaks of foodborne illness. *Calif. Morbid.* 37:1.
- AOAC International. 1995. Official methods of analysis, 16th ed. AOAC International, Washington, DC.
- Asensio, M. A., J. A. Ordóñez, and B. Sanz. 1988. Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf life of refrigerated pork packed in plastic bags. *J. Food Prot.* 51:356–360.
- Augustin, J. C. 1996. Résistance de *Listeria monocytogenes* aux traitements physiques. *Pathol. Biol.* 44:790–807.
- Baranyi, J., and T. A. Roberts. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 26:199–218.
- Benedito, J., M. I. Cambero, C. Ortuño, M. C. Cabeza, J. A. Ordóñez, and L. de la Hoz. 2011. Modeling and optimization of sensory changes and shelf-life in vacuum-packaged cooked ham treated by E-beam irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 80:505–513.
- Bowes, J. H., and J. A. Moss. 1962. The effect of gamma radiation on collagen. *Radiat. Res.* 16:155–162.
- Brewer, M. S. 2004. Irradiation effects on meat color: a review. *Meat Sci.* 68:1–17.
- Brewer, M. S. 2009. Irradiation effects on meat flavor: a review. *Meat Sci.* 81:1–14.
- Cabeza, M. C., M. I. Cambero, L. Hoz, and J. A. Ordóñez. 2007. Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innov. Food Sci. Emerg.* 8:299–305.
- Cabeza, M. C., M. I. Cambero, M. Núñez, M. Medina, L. de la Hoz, and J. A. Ordóñez. 2010. Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiol.* 27:777–782.
- Cabeza, M. C., L. de la Hoz, R. Velasco, M. I. Cambero, and J. A. Ordóñez. 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. *Meat Sci.* 83:320–327.
- Christopher, F. M., C. Vanderzant, Z. L. Carpenter, and G. C. Smith. 1979. Microbiology of pork packaged in various gas atmospheres. *J. Food Prot.* 42:324–327.
- Church, I. J., and A. L. Parsons. 1995. Modified atmosphere packaging technology: a review. *J. Sci. Food Agric.* 67:143–152.
- Clavero, M. R. S., J. D. Monk, L. R. Beuchat, M. P. Doyle, and R. E. Brackett. 1994. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, salmonellae and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2069–2075.
- Dainty, R. H., and C. M. Hibbard. 1980. Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *J. Appl. Bacteriol.* 48:387–396.
- Dainty, R. H., and B. M. Mackey. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol.* 73:103–104.
- Dainty, R. H., B. G. Shaw, and T. A. Roberts. 1983. Microbial and chemical changes in chill-stored red meats, p. 151–178. In T. A. Roberts and F. A. Skinner (ed.), *Food microbiology: advances and prospects*. Academic Press, London.
- Du, M., and D. U. Ahn. 2002. Effect of antioxidants on the quality of irradiated sausages prepared with turkey thigh meat. *Poult. Sci.* 81: 1251–1256.
- Du, M., S. J. Hur, and D. U. Ahn. 2002. Raw-meat packaging and storage affect the color and odor of irradiated broiler breast fillets after cooking. *Meat Sci.* 61:49–54.
- Edwards, R. A., R. H. Dainty, C. R. Hibbard, and S. V. Ramantanis. 1987. Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 63:427–434.

30. El-Shenawy, M. A., A. E. Yousef, and E. H. Marth. 1989. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in broth or in raw ground beef. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 22:387–390.
31. El-Zawahry, Y. A., and D. B. Rowley. 1979. Radiation resistance and injury of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:50–54.
32. Farber, J. M., and E. Daley. 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* on modified-atmosphere packaged turkey roll slices. *J. Food Prot.* 57:1098–1100.
33. Faustman, C., and R. G. Cassens. 1990. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *J. Muscle Foods* 1:217–243.
34. Fennema, O. R. 1985. Food chemistry, p. 23–67. Marcel Dekker, New York.
35. Gill, C. O., and K. G. Newton. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperature. *J. Appl. Bacteriol.* 43:189–195.
36. Gill, C. O., and M. P. Reichel. 1989. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol.* 6:223–230.
37. Giroux, M., B. Ouattara, R. Yefsah, W. Smoragie, L. Saucier, and M. Lacroix. 2001. Combined effect of ascorbic acid and gamma irradiation on microbiological and sensorial characteristics of beef patties during refrigerated storage. *J. Agric. Food Chem.* 49:919–925.
38. Glass, K., and M. P. Doyle. 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1565–1569.
39. Grant, I. R., and M. F. Patterson. 1992. Sensitivity of foodborne pathogens to irradiation in the components of a chilled ready meal. *Food Microbiol.* 9:95–103.
40. Hashisaka, A. E., S. D. Weagant, and F. M. Dong. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation. *J. Food Prot.* 52:490–492.
41. Herrero, A. M., J. A. Ordóñez, M. D. Romero de Ávila, B. Herranz, L. de la Hoz, and M. I. Cambero. 2007. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Sci.* 77:331–338.
42. Honikel, K. O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Sci.* 49:447–457.
43. Huhtanen, C. N., R. K. Jenkins, and D. W. Thayer. 1989. Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52:610–613.
44. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2002. Microbiological testing in food safety management, p. 313–332. In *Microorganisms in foods*, vol. 7. Microbiological testing in food safety management. Kluwert Academic/Plenum Publishers, New York.
45. International Organization for Standardization. 1981. Analyze sensorielle. Guide pour l'implantation d'un local destiné aux analyses sensorielles. ISO/DP 66.58. International Organization for Standardization, Geneva.
46. Jo, C., and D. U. Ahn. 2000. Production of volatile compounds from irradiated oil emulsions containing amino acids or proteins. *J. Food Sci.* 65:612–616.
47. Kampelmacher, E. H. 1983. Irradiation for control of *Salmonella* and other pathogens in poultry and fresh meats. *Food Technol.* 37:117–119.
48. Kauffman, R. G., G. Eikelenboom, P. G. van der Wal, G. Merkus, and M. Zaar. 1986. The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature. *Meat Sci.* 18:191–198.
49. Lacroix, M. L., W. Smoragiewicz, M. Jobin, B. Latreille, and K. Krzystyniak. 2002. The effect of irradiation of fresh pork loins on the protein quality and microbiological changes in aerobically- or vacuum-packaged. *Radiat. Phys. Chem.* 63:317–322.
50. Lakritz, L., R. J. Carroll, R. K. Jenkins, and G. Maerker. 1987. Immediate effects of ionizing radiation on the structure of unfrozen bovine muscle tissue. *Meat Sci.* 20:107–117.
51. Lambert, A. D., J. P. Smith, and K. L. Dodds. 1992. Physical, chemical and sensory changes in irradiated fresh pork packaged in modified atmosphere. *J. Food Sci.* 57:1294–1299.
52. Lambropoulou, K. A., E. H. M. Drosinos, and G.-J. E. Nychas. 1996. The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 30:281–291.
53. Leistner, L., and W. Rödel. 1976. The stability of intermediate moisture foods with respect to micro-organisms, p. 120–137. In R. Davies, G. G. Birch, and K. J. Parker (ed.), *Intermediate moisture foods*. Applied Science Publishers, London.
54. Livingston, M., M. S. Brewer, J. Killifer, B. Bidner, and F. McKeith. 2004. Shelf life characteristics of enhanced modified atmosphere packaged pork. *Meat Sci.* 68:115–122.
55. López-Gálvez, D. E., L. de la Hoz, M. Blanco, and J. A. Ordóñez. 1998. Refrigerated storage (2°C) of sole (*Solea solea*) fillets under CO₂-enriched atmospheres. *J. Agric. Food Chem.* 46:1143–1149.
56. Lycometros, C., and W. D. Brown. 1973. Effects of gamma irradiation on myoglobin. *J. Food Sci.* 38:971–977.
57. Mackey, B. M., and A. Kerridge. 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonellae in minced beef. *Int. J. Food Microbiol.* 6:57–65.
58. Mann, J. E., L. Smith, and M. M. Brashears. 2004. Validation of time and temperature values as critical limits for *Salmonella* and background flora growth during the production of fresh ground and boneless pork products. *J. Food Sci.* 67:1389–1393.
59. Maxcy, R. B., and N. R. Tawari. 1973. Radiation prevention of foods. International Atomic Energy Agency, Vienna.
60. McKellar, R. C., R. Moir, and M. Kalab. 1994. Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retail wieners. *J. Food Prot.* 57:387–392.
61. Mendonca, A. F., M. G. Romero, M. A. Lihono, R. Nannapaneni, and M. G. Jonson. 2004. Radiation resistance and virulence of *Listeria monocytogenes* Scott A following starvation in physiological saline. *J. Food Prot.* 67:470–474.
62. Morgan, I. R., F. L. Krauttil, and J. A. Craven. 1991. Evaluation of the effect of abattoir hygiene and pre-slaughter management on the microbiological quality of meat. Research report series. Vic. 22. Victorian Department of Agriculture, Melbourne, Australia.
63. Nam, K. C., and D. U. Ahn. 2003. Combination of aerobic and vacuum packaging to control color, lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated raw turkey breast. *Meat Sci.* 63:389–395.
64. Nanke, K. E., J. G. Sebranck, and D. G. Olson. 1998. Color characteristics of irradiated vacuum-packaged pork, beef and turkey. *J. Food Sci.* 63:1001–1006.
65. Nawar, W. W., R. Zhu, and Y. J. Yoo. 1990. Radiolytic products of lipids as markers for the detection of irradiated foods, p. 13–24. In D. E. Johnston and M. H. Stevenson (ed.), *Food irradiation and the chemist*. Special publication 86. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
66. Newton, K. G., J. C. L. Harrison, and K. M. Smith. 1977. The effect of storage in various gaseous atmospheres on the microflora of lamb chops held at 21°C. *J. Appl. Microbiol.* 43:53–59.
67. Niemand, J. G., H. J. Van der Linde, and W. H. Holzapfel. 1983. Shelf-life extension of minced beef through combined treatments involving radurization. *J. Food Prot.* 46:791–796.
68. Olson, D. G. 1998. Irradiation processing, p. 3–27. In E. Murano (ed.), *Food irradiation: a sourcebook*. Meat and poultry irradiation short course. Iowa State University Press, Ames.
69. Ordóñez, J. A., B. Perez de Castro, M. A. Asensio, and B. Sanz. 1991. Selected chemical and microbiological changes in refrigerated pork stored in carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres. *J. Agric. Food Chem.* 39:668–672.
70. Parry, R. T. 1993. Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods. Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, Glasgow, UK.
71. Patterson, M. F. 1988. Sensitivity of bacteria to irradiation on poultry meat under various atmospheres. *Lett. Appl. Microbiol.* 7:55–58.
72. Satterlee, L. D., W. D. Brown, and C. Lycometros. 1972. Stability and characteristics of the pig meat produced by gamma irradiation of metmyoglobin. *J. Food Sci.* 37:213–217.

73. Segars, R. A., A. V. Cardello, and J. S. Cohen. 1981. Objective and subjective texture evaluation of irradiation sterilized meat products. *J. Food Sci.* 46:999–1003.
74. Sommers, C., X. Fan, B. A. Niemira, and K. Sokorai. 2003. Radiation (gamma) resistance and post irradiation growth of *Listeria monocytogenes* suspended in beef bologna containing sodium diacetate and potassium lactate. *J. Food Prot.* 66:2051–2056.
75. Tappel, A. L. 1956. Regeneration and stability of oxymyoglobin in some gamma irradiated meat. *Food Res.* 21:650.
76. Tewari, G., D. S. Jayas, and R. A. Holley. 1999. Centralized packaging of retail meat cuts: a review. *J. Food Prot.* 62:418–425.
77. Thippareddi, H., R. K. Phebus, D. Y. C. Fung, and C. L. Kastner. 1995. Use of universal pre-enrichment medium supplemented with Oxyrase™ for the simultaneous recovery of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica*. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 4:37–50.
78. Urbain, W. M. 1986. Food irradiation, p. 52–57. In *Food science and technology*. Academic Press, Orlando, FL.
79. U.S. Food and Drug Administration, Food Safety and Inspection Service. 2003. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Docket 1999N-1168, vols. 23–28. U.S. Food and Drug Administration, Food Safety and Inspection Service, Washington, DC.
80. Velasco, R., J. A. Ordóñez, M. C. Cabeza, L. de la Hoz, and M. I. Cambero. 2011. Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. *Int. Dairy J.* 21:493–500.
81. Yoon, K. S. 2003. Effects of gamma irradiation on the texture and microstructure of chicken breast meat. *Meat Sci.* 63:273–277.
82. Zhu, M. J., A. Mendoca, and D. U. Ahn. 2004. Effect of temperature abuse on the quality of irradiated pork loins. *Meat Sci.* 67: 643–649.

ARTÍCULO 2

**Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of
marinated pork loin**

International journal of microbiology. 2012. ID 962846

DOI: 10.1155/2012/962846

Research Article

Use of E-Beam for Shelf-Life Extension and Sanitizing of Marinated Pork Loin

I. García-Márquez, J. A. Ordóñez, M. I. Cambero, and M. C. Cabeza

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to J. A. Ordóñez, pereda@vet.ucm.es

Received 24 May 2012; Revised 15 October 2012; Accepted 16 October 2012

Academic Editor: Marco Gobetti

Copyright © 2012 I. García-Márquez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The effectiveness of E-beam radiation to extend the shelf-life of marinated pork loin slices stored at 4 and 8°C (temperature abuse) has been studied. The shelf-life was extended from 7 to 16 and >20 days after the application of 1 and 2 kGy, respectively. In the event of a temperature abuse occurring during the product distribution (e.g., increase to 8°C), the shelf-life would be extended from 5 to 10 and 16 days, respectively, when applying the doses mentioned previously. From a public health point of view, the irradiation of marinated pork loin may be marketable for a longer period of time of up to two weeks, and guarantees a practically *Salmonella* and *Listeria*-free product. Minor changes are produced by the E-beam treatment in the main sensory and rheological characteristics. The odor was the most affected feature, but the off-odors diminished with increased storage. In any case, testers judged the samples to be adequate for marketing.

1. Introduction

In order to diversify the meat products consumed by the population, the meat industry has implemented marinating technology to help satisfy the psychological need of consumers to broaden their choice of foods and to maintain its market share. Several studies have been carried out to optimize this technology in different kind of meats, namely, beef, pork, and poultry [1–5] although, according to the authors of former papers, marinated pork is, perhaps, the most common. The marinating is based on the water-binding capacity of several compounds, such as sodium chloride, sodium lactate, calcium lactate, lactic acid, and calcium chloride. The salt plays several functions and provides some functional properties to the meat. As a bacteriostatic agent, the salt increases the shelf-life of meat and meat products by reducing the growth rate of spoilage bacteria [6, 7]. Similarly, the salt activates the protein to increase hydration and its water holding capacity, thus increasing the binding

properties of proteins, which is an important effect since the meat proteins can swell to twice their original size [7]. Additionally, salt improves the texture [8, 9] and palatability [1] by increasing its juiciness [10], and it also improves the tenderness and overall acceptability [11, 12]. The addition of sodium lactate was shown to improve color and to help to stabilize this feature during storage [13–15].

Fresh meat presents a highly variable microbiota [16, 17] but regardless of the initial number of organisms, the most common spoilage of fresh meat in air-stored conditions is dominated by Gram-negative, psychrotrophic, aerobic rod-shaped bacteria. Although a wide range of genera are present on meat, only *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* (formerly some *Acinetobacter* and *Moraxella*) species are normally considered to be important [18]. Of these, *Pseudomonas* species are of greatest concern [19, 20]. *Pseudomonas* spp. typically account for >50% of the total microbiota and sometimes even up to 90% [18]. The spoilage is manifested by the release of off-odors when the number of

bacteria reaches the level of about 5×10^7 CFU/cm² and the appearance of slime when the bacterial load reaches the value 10^8 CFU/cm² [21, 22].

Marinated meat products have some of the benefits discussed above, but they may have an added problem and limited food safety, since there may be pathogenic cross-contamination during processing and storage, as well as from raw materials such as fresh meat, sauce, and fresh vegetables [23, 24].

Marinated pork is mainly distributed by the industry as whole pieces but they are usually displayed as slices packed in family-sized portions exposed on the refrigerated shelves of supermarkets so that consumer can freely choose the product, which is then cooked at home. The slices preparation involves manipulation during which the product may be potentially contaminated with pathogen bacteria from the environment, handlers, equipment, and so forth. An additional problem is the temperature abuse (e.g., increase to 7–10°C), which could occur during distribution. Among the pathogens that may be encountered, those of the greatest concern are *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. They can be considered ubiquitous. In fact, they are frequently detected in a variety of foods [16]. However, *L. monocytogenes* is the most dangerous of the two organisms since it is a facultative anaerobic, which grows even under strict refrigeration [25, 26], while *Salmonella* spp. are not able to multiply at refrigerated temperatures but they can at >7°C [26, 27]. Another highly dangerous pathogen is *Escherichia coli* O157:H7 since it is responsible for a severe disease process [26, 28]. However, it is less frequent and unable to grow under refrigerated conditions but, like *Salmonella* spp., it can multiply when there is an uncontrolled increase in temperature. Thus, the risk of the food-borne pathogens growth may be higher when there is a temperature abuse by retailers and consumers [29].

The shelf-life of fresh pork loin is very short. It does not last any longer than 5–7 days under refrigeration [30]. It may be considered that the marinated pork also has a short shelf-life since this is an uncooked product. Considering to the current trade situation of perishable foods over long distances, it is obvious that any action applied to increase the shelf-life of this product would be very useful from a commercial point of view. The present work proposes the treatment with accelerated electrons (E-beam) to extend its shelf-life. This treatment is also useful to substantially reduce the potential pathogens that may be present since that E-beam is an effective procedure to kill vegetative pathogen bacteria [31–36].

2. Materials and Methods

2.1. Organisms. *Salmonella* spp. resistance against E-beam radiation is similar to that of *L. monocytogenes* [37, 38], and it has been repeatedly demonstrated that *E. coli* O157:H7 is more radiosensitive than *L. monocytogenes* [31, 33, 37]. Therefore, the results obtained for the *L. monocytogenes* may also be extended to two other species with a high confidence range (95%) due to the psychrotrophic character of *L. monocytogenes*. This feature must be kept in mind to optimize

the treatment and research objectives. Likewise, in previous works, we have observed [34] that *L. innocua* NCTC 11288 is more radioresistant than five strains of *L. monocytogenes*. Accordingly, *L. innocua*, as a surrogate of *L. monocytogenes*, was used as the target organism for experiments.

L. innocua NCTC 11288 was supplied by the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia University, C. Dr. Moliner s/n. Burjassot, 46100. Valencia. Spain). Fresh cultures were prepared by removing a piece of frozen culture and inoculating it into trypticase soy broth, then incubating at 32°C for 24 h. The culture was subsequently centrifuged at 4°C and the pellet suspended in a sterile test tube with 10 mL sterile saline, which yielded a bacterial load that was close to 10^8 cells/mL. The handling, subculture, and inoculum preparation of *L. innocua* and sample contamination have been previously described for other meat product slices [34, 35].

2.2. Sample Preparation and Irradiation Treatment. Marinated pork loins were prepared in a local industry under supervision of one of the authors. Whole loins were placed in a rotating drum, in which they were massaged for 15 min in a brine consisting of (w/v) salt (1.6%), nitrates and nitrites (0.025% of KNO₃/NaNO₂ (2/1) (w/w)), sodium ascorbate (0.080%), and spices (1.4% of a mixture of white pepper/paprika (2/12) (w/w)). Then, they remain submerged in the brine for 2 days at 2–4°C. Slices (4–6 mm thickness) were cut from freshly marinated pieces (3–4 Kg in weight) using an electric machine, whose rotating blade and contact surfaces were previously deeply cleaned with hot water (around 90°C) and ethanol 70°. Following this, 2–4 slices were packaged in low permeability plastic (60 µm copolymer of polyamide/polietilene) bags (diffusion coefficient of 35 cm³/24 h m² bar to oxygen and 150 cm³/24 h m² bar to carbon dioxide) and heat-sealed without air exclusion. The gases ratio for filling bags was air/meat 4/1 (volume bag/sample weight). Samples were transported to the irradiation plant in refrigerated boxes. They were treated in an industrial electron beam radiation source, which operates at 10 MeV located in Tarancón, Cuenca, Spain, 60 km from the laboratory. The radiation doses employed were between 0.2 and 3 kGy, namely, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 kGy and the dose absorbed by samples was verified considering the absorbance of cellulose triacetate dosimeters [39] simultaneously irradiated.

To determine the inactivation of *L. innocua*, slices were contaminated by immersion for 10 sec in the cell suspension (higher than 10^8 cells/mL formerly described [34], which yield an initial load of approximately 10^8 CFU/cm². A large number of cells ($>10^7$ cells/cm²) were used to determine the death kinetic parameters accurately. The contaminated (one slice per trial for microbial analysis) and uncontaminated (four-five slices for physicochemical or sensorial analysis) samples were packaged as mentioned above. Experiments were performed at room temperature (18–20°C) by triplicate. The temperature increase during treatment was less than 2°C. Following the irradiation treatment, samples were transported (less than 1 h) in insulated boxes to the laboratory and they were stored in thermostated chambers at 4 and

8°C, the latter was used as an example of temperature abuse during product distribution.

2.3. Microbial Analysis. To count the survivors, an aliquot (about 1 g) were homogenized with 10 mL of a sterile saline solution in a Stomacher bag. Total viable counts (TVC) were determined by the pour-plate method using Plate Count Agar (PCA; Difco, Detroit, MI, USA) containing 2% (w/v) NaCl [40, 41] as the culture medium. Plates were incubated for 48 h at 32°C. Lactic acid bacteria (LAB) were enumerated in double layer MRS agar (Conda-Pronadisa, Madrid, Spain) at pH 5.5 [42, 43]. The incubation was carried out at 32°C for 48 h. *Enterobacteriaceae* were counted in violet red bile glucose agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) after an incubation of 24 h at 37°C. *Pseudomonas* spp. counts were determined after incubation at 25°C for 48 h in pseudomonas agar base, supplemented with cetrinide, fucidin, and cephalosporin (Oxoid), *Brochothrix thermosphacta* was enumerated in STAA (Oxoid) at 25°C for 48 h. The selective Palcam medium (Oxoid) for *Listeria* spp. was elected to assay the survival counts of this organism and to avoid the growth of endogenous microbiota. Colonies were enumerated with a Digital S Colony counter (J.P. Selecta, Barcelona, Spain). The growth curves were constructed according to the Baranyi model [44].

In shelf-life experiments, irradiated and nonirradiated loin slices were removed from the trays, in which several groups of organisms were periodically determined. From a microbiological point of view, the end of shelf-life was established when the total viable counts exceeded the value of 5×10^7 CFU/cm². Analyses were performed just after E-beam treatment (0 days) and at various times during storage until the end of the shelf-life.

2.4. Dry Matter, pH, and Water Activity (a_w). The dry matter was analyzed by the oven air-drying method (AOAC, 1995). The marinated loin pH was determined in a homogenate of the sample with distilled water (1:10) (w/v), using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). The a_w was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25°C.

2.5. Water-Holding Capacity (WHC). The WHC was measured by using the Carver Press Method [45]. The meat sample (0.3 g) was placed on a piece of filter paper (Whatman no. 1, 125 mm), then set between two plexiglas plates, and subjected to a mechanical force of 345 kPa for 5 min. The WHC values were calculated as the percentage of water retained based on water content in the product before pressing. Four replicates of each sample were determined.

2.6. Texture Measurements. The texture analysis were performed according to previous works [46, 47]. Texture tests were performed at about 22°C just after opening the bags. The TPA and tensile test were performed with a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) using a cylindrical probe P/25 for TPA

or a tensile grip (A/TGT) for the tensile test. The TPA was assayed in cylinders (1.5 cm high by 2 cm wide), and the tensile test was carried out on prismatic pieces (6 cm long, 2 cm wide, and 0.4 cm thick) of marinated loin samples. The resulting textural parameters were calculated as previously described by Herrero et al. [47].

2.7. Color Measurements. The measurements were performed using a tristimulus colorimeter (Minolta Chroma Meter CR300, Minolta Corporation, NJ). The values of the lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) parameters were periodically (0, 5, and 10 days of storage at 4°C) measured 5–8 times on the surface of the E-beam treated and control (nontreated) slices at three different analyse times (0, 4, and 24 h to air exposure after opening the packaged bags). After the first color measurement, samples were kept at $6 \pm 2^\circ\text{C}$ and about $64 \pm 2\%$ relative humidity, without protection (similar conditions to a refrigerated display or a domestic refrigerator). Color parameters were determined in non-treated and treated samples at 0, 5, and 10 days of storage at 4°C.

2.8. Sensory Analysis. The sensory analyses involved a panel of twenty tasters (ten females and ten males) selected from the members of the Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Slices treated at 0, 1, and 2 kGy were used for sensory analysis. The following tests were performed: a triangular analysis, a rank order test, and a descriptive trial. The tests were carried out in individual booths built according to the International Standards Organization DP 66.58 [48] criteria. The analyses were carried out as described previously [49]. For the flavor analysis, pork loin steaks with a thickness of 0.5 cm were cooked during 2 min on each side using a grill-pan previously heated to 150°C. The temperature inside the steaks reached approximately 70°C, as measured by a portable digital thermometer (Testo model 735; Testo, S.A., Barcelona, Spain). This treatment was considered sufficient to obtain a good final degree of doneness. The appearance and odor were evaluated in raw and cooked samples. Only samples stored at 4°C were used for sensory analysis. The range order test was performed until the end of the shelf-life of untreated samples. Triangular and descriptive tests were performed until the end of the shelf-life of the untreated and treated samples.

2.9. Statistical Analysis. Survival curves were obtained by plotting the logarithm of the number of survivors against the dose assayed. Decimal reduction dose (D -values) were calculated from the linear regression equation of survival curves. Regression equations, coefficients of determination (R^2) and the error bars were calculated by Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). In the case of the data obtained with the physicochemical analysis, the differences among means were established by ANOVA and Duncan's multiple comparison procedure. These statistical analyses were performed using a Statgraphic Plus version 5.0 program.

TABLE 1: Effect of E-beam treatment on the water holding capacity (WHC) of marinated pork loin following treatment and 8 days of storage at 4 and 8°C.

Doses	Day 0	Day 8 (4°C)	Day 8 (8°C)
0 kGy	41.37 ± 2.7 ^b	54.32 ± 1.8 ^a	51.95 ± 0.99 ^a
1 kGy	51.37 ± 8.15 ^a	36.64 ± 6.9 ^b	34.34 ± 6.48 ^b
2 kGy	48.32 ± 1.78 ^a	43.51 ± 3.2 ^b	33.06 ± 7.17 ^b

^{a,b} Values at the same column with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. Physicochemical Characteristics. The fresh pork loin used in this research had average moisture content values of $74.16 \pm 1.56\%$, an ash concentration of $1.88\% \pm 0.19\%$, dry matter content of $27.3 \pm 1.6\%$, $a_w = 0.992 \pm 0.005$, and $pH = 5.71 \pm 0.037$. The effect of E-beam treatment (1 and 2 kGy) on the former parameters was negligible, except for WHC (Table 1). These results, excluding the latter feature, are in total agreement with previous data obtained for E-beam treated fresh pork loin [30]. The effect of radiation on the pH has been of concern of other authors. There were not observed effects in pork loin [50, 51] nor in ground beef patties [52] even when ascorbic acid was added to samples and they were treated with a dose as high as 10 kGy [52].

The effect of E-beam irradiation (1 and 2 kGy) on the WHC of the marinated product is recorded in Table 1. The slices showed a significant increase of the WHC ($P < 0.05$) just after the E-beam treatment. This result is completely opposite to what occurred in fresh loin, in which a decrease of the WHC was found [30]. Other authors [51, 53] have also reported a decrease in WHC, an increase in soluble protein, and exudates loss in irradiated pork *longissimus dorsi* muscle. These effects may be associated with changes produced by the irradiation in the muscle tissue structure, for example, an increase in the shrinkage of the myofibrils, as observed by Yoon [54] in chicken breast irradiated at 2.9 kGy. The WHC increase observed in marinated pork may be due to the absorption of exudates by the marinating compounds. This fact could be considered a positive effect since no fluids, or a lower quantity than in fresh pork, would be accumulated in the packaged bags.

3.2. Shelf-Life Aspects. Spoilage is a major concern in the food industry. In meat, the spoilage becomes apparent by the release of off-odors although there may be other phenomena such as color changes that also limit the shelf-life. To assay the effect of the E-beam application on the shelf-life of marinated pork loin, the changes in the total viable organisms in slices stored at 4 and 8°C (temperature abuse) for 25 days were studied (Figure 1). At 4°C, the initial total microbial count (TVC at day 0) of nonirradiated slices (control samples) was $4.0 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$. The treatment at 1 and 2 kGy caused a reduction of the bacterial number of about 1.6 and 2.2 log units, respectively. These data allow to approximately determine a D -value of about 0.90 kGy. This value is much higher than the one previously estimated

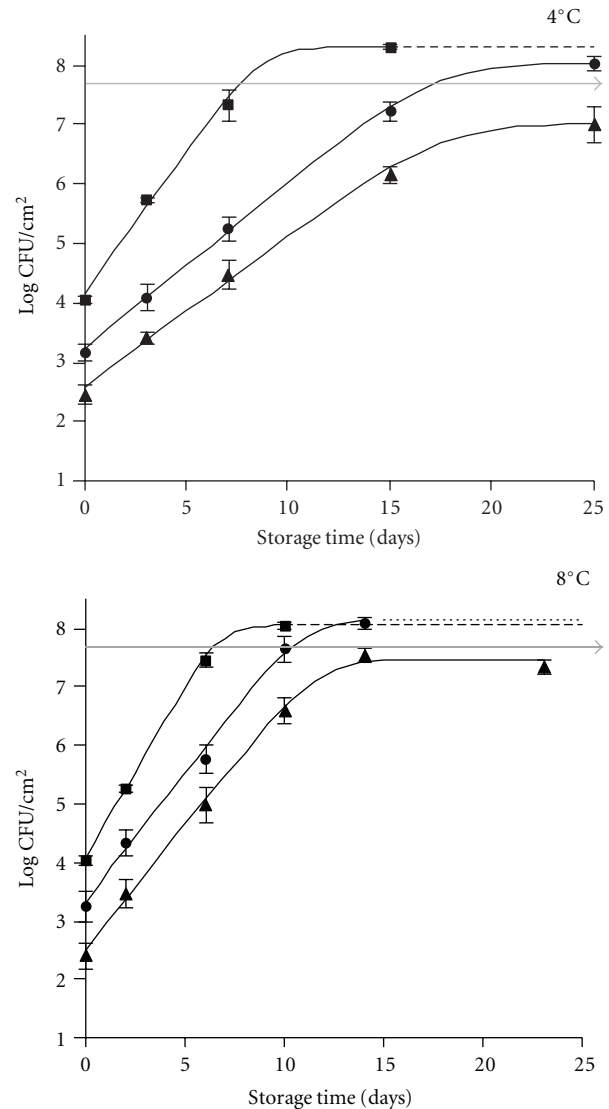


FIGURE 1: Changes in the total viable counts of marinated pork loin slices subjected to E-beam treatment and stored at 4°C and 8°C. Control (■), treated at 1 (●), and 2 kGy (▲).

in whole fresh loin [30]. The initial microbiota of raw intact meat is very complex. Usually, counts range from 10^3 – $10^5 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ [55, 56] but only 10% of the microbial population is able to continue growth upon refrigeration [57]. Both Gram-positive (*Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., lactic acid bacteria, and the coryneform group) and Gram-negative (*Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp., *Psychrobacter* spp., and *Acinetobacter* spp.) bacteria have been detected [17]. Given this variety of bacteria, it is not easy to assert those microbial groups that are most affected by the radiation. The overall estimated D -value (0.90 kGy) was similar to the one reported by other authors for some vegetative bacteria, including lactic acid bacteria [58, 59] and the ubiquitous enterococci [60]. It is also close to that of the pathogens *S. aureus* [36, 61], *Salmonella* spp. [35, 61], and *L. monocytogenes* [34, 62] but higher than

other pathogens, such as *Y. enterocolitica* and many gram-negative bacteria, in which *D*-values of 0.2–0.8 have been commonly reported [63–65]. According to the former values, it seems that the *D*-values of 0.90 kGy correspond to the radioresistance of Gram-positive bacteria. The Gram-negative bacteria were probably promptly reduced at very low levels and their survivors were unable to compete with the Gram-positive survivors. Therefore, the *D*-value only reflects the E-beam resistance of the Gram-positive bacteria.

The initial total TVC determined in the fresh product (4.0 log units CFU/cm²) was in the range of the contamination reported by several authors [17, 55, 56]. The “lag phase” for TVC of nontreated samples was not observed at 4 nor at 8°C. Therefore, the natural microbiota began to multiply in the exponential growth phase, reaching the spoilage level (7.5 log units) after 7 and 5 days, respectively. The changes in the microbiota of the control samples during storage was in total accordance with Ayres’ 1960 report [21], in which meat spoilage under refrigeration was exhaustively explained. A generation time (*g*-value) of 15 h was estimated at 4°C. Practically, the same pattern was observed in nontreated samples stored at 8°C, but, as expected, the *g*-value underwent a substantial decrease (*g*-value = 12.5 h) and, therefore, the shelf-life was shortened; it was estimated to be about 5 days. The shelf-life values were somewhat higher than those described by other authors [30, 66] in fresh pork. Therefore, the marinating compounds seem to have had an inhibitory effect on the indigenous microbiota. As the pH and *a_w* averages were in the level of those of fresh meat, some marinating compounds, namely, the species, may be responsible for the growth inhibition of the microbiota, which are endowed of antimicrobial effects [67], the Gram-negative bacteria being more sensitive than Gram-positive and LAB being the most resistant among the latter [68].

No characterization of the dominant microbiota was made but, according to the manifestation of spoilage (off-odor, putrid, cabbage), they most certainly were the aerobic spoilage organisms, that is, the Gram-negative bacteria, as has been described many times [17, 21, 69, 70]. The low permeability of the bags used in the experiments does not allow the rapid interchange of gases but even though oxygen is partially depleted by the microbial and residual tissue metabolism [71] the concentration of this gas in the bag is enough to allow the growth of aerobic bacteria at a growth rate similar to that observed in a nonrestricted atmosphere of air [70]. In fact, several studies have claimed that *Pseudomonas* spp. can grow in atmospheres of 1–2% of oxygen, even in presence of carbon dioxide [72].

The decrease caused in the initial bacterial load by the E-beam treatment resulted in a deceleration of its growth, which, in turn, led to a noticeable shelf-life extension (approximately a duplication) at 4°C since the value of 7.5 logs units was reached after 16 days with an estimated *g*-value of about 26 h. As expected, the same effects were observed when samples were stored at 8°C but a lower shelf-life extension was estimated (10 days). A similar model has been previously observed in fresh pork loin [30], and the shelf-life extension was attributed to both the lethal effect

of E-beam and the deceleration of the growth rate of the surviving spoilage organisms. When doses of 2 kGy were applied, the shelf-life extension at 4°C was longer but at the end of the experiment (25 day) the level of log 7.5 CFU/cm² was not reached. The former data allow to conclude that the application of a low dose of radiation is a useful procedure to attain an important significant shelf-life extension (16–25 days) even when a dose as low as 1 kGy is applied. These results may be of great importance from a commercial perspective since the marinated loin slices (and probably other anatomical regions of the carcass) may be displayed on the shelves of refrigerated cabinets for longer periods of times.

A lower degree of pork protection is achieved if a temperature abuse occurs since the surviving organisms will grow more rapidly and the time period during which the meat presents adequate conditions for consumption will be shorter. From the curves in Figure 1(b), *g*-values of about 18 h may be estimated regardless of whether the treatment was 1 or 2 kGy. The shelf-life at 8°C of E-beam treated marinated pork slices at 1 or 2 kGy was no longer than 10 or 15 days, respectively. The differences in the shelf-life were simply because the treatment of 2 kGy caused a greater reduction of the bacterial population and, therefore, the initial TVC was lower. Results indicate that E-beam treatment is also useful to extend the shelf-life for a significant period of time even at 8°C. Table 2 shows a summary of shelf-life results. The marinated process leads to an increase in the shelf-life. However, the temperature abuse could originate public health problems because the higher temperature may promote the growth of pathogen organisms, if present, such as *Salmonella* spp. and *S. aureus*, since they are able to grow at 8°C but unable to grow at 4°C [26].

The changes in the LAB counts during storage are shown in Figure 2. As expected, the E-beam caused a reduction in the initial number of LAB and a *D*-value of about 0.85 kGy was determined. It was higher than that obtained for TVC counts, which may be a consequence only LAB are involved in the counts since the medium used for counting (MRS agar) is selective for these organisms. Actually, the LAB are, among the nonsporeforming bacteria, the organisms with a high resistance to the ionizing radiation [58, 59]. These results are close to those reported by other authors for LAB in meat, since a treatment of 2.5 kGy produced only a 3.4 log reductions while more than five reductions were observed for other bacteria such pseudomonads, Enterobacteriaceae or *B. thermosphacta* [58]. The changes in the LAB during storage are noticeable because it is not frequent to observe these bacteria as a dominant group in the aerobically stored meat and, on the other hand, at both temperatures and at any treatment doses (0, 1, or 2 kGy) the behavior pattern was the same with the only difference being in the *g*-value. It was about 23 h at 4°C and 15 h at 8°C, which is considered logical since the greater the temperature the higher the growth rate. The LAB are the dominant organisms in marinated vacuum-packed pork at the expiration date [73], but it is difficult to explain the behavior of the LAB in the control slices under aerobic conditions. This behavior may be attributed to the carbon dioxide atmosphere enrichment as a consequence of

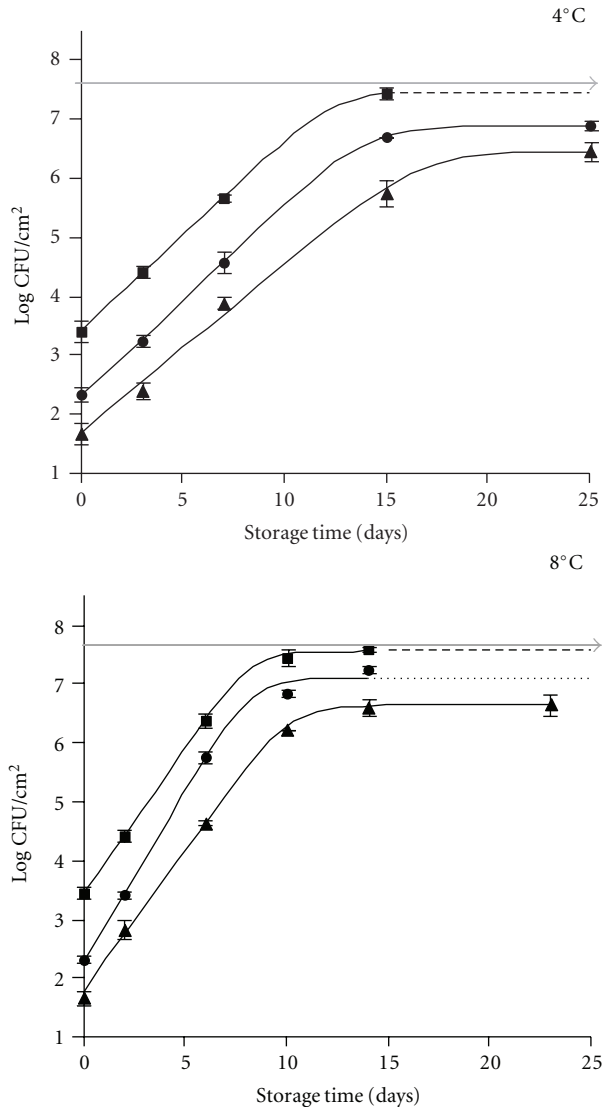


FIGURE 2: Changes in the lactic acid bacteria counts of marinated pork loin slices subjected to E-beam treatment and stored at 4°C and 8°C. Control (■), treated at 1 (●), and 2 kGy (▲).

the low permeability of the bag plastic. The microaerophile condition of the LAB is well known. Certainly, they have to compete with aerobic Gram-negative with a lower g -value (e.g., at 4°C, 15 h for TVC versus 23 h for LAB), which is reflected, for example, on day 15 at 4°C where the count of LAB was a log unit lower (10%) than that of TVC. In E-beam treated samples the circumstance described above coupled to the original very low level of Gram-negative bacteria since their numbers were severely reduced by the ionizing treatment and, therefore, the LAB (more radioresistant) have less organisms with which to compete.

In control samples, the counts in the selective pseudomonas medium were very low in the first days of storage but by the 5th day $\log 5.0$ CFU/cm² colonies were counted and by the 7th day the level reach the value of $\log 7.5$ CFU/cm² (data not shown). The latter value is in total

TABLE 2: Shelf-lives at 4 and 8°C of fresh and marinated pork loin subjected to E-beam treatment.

Dose (kGy)	Fresh*	Marinated	Fresh*	Marinated
	4°C	4°C	8°C	8°C
0	5	7	3	5
1	11	16	8	10
2	20	>20	16	16

* Data from [30]. Shelf-life was established when the total viable counts exceeded 5×10^7 CFU/cm².

agreement with TVC data, which suggests that pseudomonads were the dominant organisms at the end of the shelf-life, as has been reported by other authors [17, 69, 70]. In E-beam treated (1 and 2 kGy) samples, it was not possible to monitor the changes in the pseudomonad population during storage. The counts in the selective medium for these organisms were not consistent, which has also been observed previously in fresh loin [30]. This was attributed to the selective substances (cetrimide, fucidin, and cephalosporin) added to the pseudomonas agar base to inhibit the growth of other organisms present in the samples. The E-beam may sensitize to pseudomonads, and then they were also inhibited by the supplement substances. In the case of 4°C, the temperature may act as an additional dysgenic agent.

B. thermosphacta and cold-tolerant Enterobacteriaceae bacteria also occur in aerobically-stored meat but because of their slower growth rate, they are poor competitors of the pseudomonads [18, 74]. In the present study, *B. thermosphacta* and Enterobacteriaceae were only occasionally found in control samples and at the end of the shelf-life, the former was seldom detected and the latter presented levels lower than $\log 4$ CFU/cm² at both 4 and 8°C. In irradiated samples, they were not detected at any time. Obviously, these organisms were practically eliminated by the E-beam treatment (data not shown).

3.3. Food Safety Aspects. Accidental pathogen contamination during the marinated loin slice preparation is a phenomenon that affects the slice surfaces and, on the other hand, the marinated pork loin is a product intended to be eaten once it is cooked. Consequently, the risk of pathogen organisms will be eliminated during the cooking process. Nevertheless, in an attempt to reach the highest hygienic status, many countries regulate the presence of *Salmonella*. For example, the European Community (EC no. 1441/2007) stipulates the safety criterion of absence in 10 g of products placed on the market during their entire shelf-life for *Salmonella* in "minced meat and meat preparations made from other species than poultry intended to be eaten." Furthermore, if a temperature abuse occurs, it is also possible that *Salmonella* spp., and other pathogen bacteria (e.g., *S. aureus*), unable to grow at 4°C but able to grow at >6–8°C could multiply if present. No regulation has been set by the EC for *L. monocytogenes* in relation to this kind of product. However, as the shelf-life is extended by E-beam treatment, there is, if present, an opportunity for *L. monocytogenes* to grow due to its psychrotrophic condition thereby increasing

the risk of dissemination of this organism through cross-contamination. Therefore, it seems convenient to be aware of its potential increase in numbers during the storage period. When trying to optimize any process (in this case E-beam treatment) to sanitize a meat product, taking into account the growth of *L. monocytogenes* during its shelf-life is necessary in order to eliminate it to ensure a level that guarantees the product safety. The resulting treatment will be enough to reduce the number of *Salmonella*, if present, since the latter bacterium does not grow (at 4°C) or grow more slowly (at 8°C) than *L. monocytogenes* [26]. In fact, the previous literature reports a *g*-value of 22 h at 10°C for *S. Enteritidis* [75] and 5–7 h at 9.3°C for *L. monocytogenes* [76]. For these reasons, in this work the optimization with E-beam treatment has been performed with *L. monocytogenes*, using *L. innocua* as a surrogate.

The response of *L. innocua* to the E-beam treatment was fitted to first-order inactivation kinetics, following the equation: $\log \text{CFU/cm}^2 = 7.0277 - 2.1918 \times \text{Dose}$ ($R^2 = 0.9944$), from which a decimal reduction value (*D*-value) of 0.46 kGy was calculated. This value validate the death kinetic of this bacterium in meat products since values of 0.49 kGy and 0.44 kGy were previously determined in cooked ham [34] and fresh pork loin [30]. Among nonsporeforming pathogens, *L. monocytogenes* is one of the most radioresistant bacterium [62, 63, 77, 78].

Several authors have reported increased numbers of *L. monocytogenes* in various products stored at 4–5°C. The data have been collected in a FDA report [79] from which an average increase of 0.2 log units/day may be estimated in fresh meat and 0.35 log units/day when storage is at 8°C. So, assuming a contamination in the raw marinated loin of 10 cells/cm² ($\log = 1$), as suggested by the ICMSF [80], the load of the nonirradiated loin slices will be 250 CFU/cm² at 4°C at the end of shelf-life (7 days) and 562 CFU/cm² at 8°C (shelf-life of 5 days). Nevertheless, E-beam treatment provokes a 2.17 D and 4.35 D reduction with the application of 1 and 2 kGy, respectively. Therefore, the E-beam treatment will reduce the level of listeria to 6.76×10^{-2} CFU/cm² and 4.46×10^{-4} CFU/cm², respectively. As this bacterium is able to grow under refrigeration, its numbers will increase during storage in such a way that, assuming the same growth rates, the levels will be around 107 CFU/cm² at the end of the shelf-life at 4°C (16 days) with a dose of 1 kGy and 4.57 CFU/cm² if 2 kGy was applied. In a temperature abuse situation (8°C), with similar reasoning, the *L. monocytogenes* load at the end of the shelf-life may be estimated in 214 CFU/cm² and 182 CFU/cm². Thus, the E-beam treatment has led to an important improvement of the hygienic status.

Although more than 2,000 serovars of *Salmonella enterica* are known, most infections in humans are caused by only a few serovars, the most common of which corresponds to *S. enteritidis* and *S. typhimurium* [81]. Publications [37, 61, 82] have repeatedly confirmed that the resistance of *S. typhimurium* to irradiation is significantly higher than that of *S. enteritidis*, and the *D*-value for the former organism is in the level of 0.45–0.50 kGy. Assuming a contamination similar to that of *L. monocytogenes* (i.e., 10 CFU/cm²) and a *D*-value of 0.47 kGy for *S. typhimurium*, the application

of 1 kGy or 2 kGy would reduce the number of *Salmonella* 2.13 D and 4.25 D, respectively. These figures mean that *Salmonella* loads posttreatment would be <1 CFU/10 cm² and <0.01 CFU/10 cm². These numbers do not increase at 4°C and thus, the EC microbial regulation for *Salmonella* spp. is complied. Furthermore, it has been reported in cooked ham [36] that the growth of *L. monocytogenes* after the E-beam treatment is significantly decelerated, increasing the lag and the exponential phases, which suggests that surviving organisms are not able to grow to a dangerous level. In general, it could be concluded that consumer health is safeguarded and cross-contamination minimized.

3.4. Color, Textural, and Sensory Measurements

3.4.1. Instrumental Color. The marinated loin is a product that is intended to be eaten once it has been cooked, therefore, the flavor, color and, in general, the appearance will change during the cooking process. Nevertheless, the color is, perhaps, the most important feature since the packaged product is displayed in the refrigerated cabinet shelves waiting to be chosen by the consumers. Figure 3 shows the results of the instrumental measurements of the marinated loin slice color in samples stored at 4°C. Data related to 10th day of storage of nonirradiated samples are not considered because their shelf-life ended the 7th day (Table 2) and by the 10th day the sample surface would be coated with the slime produced by Gram-negative microbiota [83]. Beside this, overall, no great differences were found, the *a** (redness) being the most affected value (Figure 3). Just after the treatment, a slight decrease (about 10–12%) of the value of this parameter was observed. However, the *a** value rose ($P > 0.05$) with increased storage irrespective of the dose applied. In addition, in each sample (treated with 0, 1, or 2 kGy and stored at 4°C postprocessed) this parameter increased with more time of air-exposure once the package was opened. All these differences were minimized as the storage was extended in such a way that after 10 days, regardless of the dose, the E-beam treated samples at the beginning (0 day to the air exposure) were slightly more red but after exposure to air for 4 or 24 h the differences were practically eliminated. In the fresh loin [30], the differences in the *a**, *b**, and *L** parameters between control and E-beam treated samples were clearer than in marinated loin. It could be attributed to the marinating substances (mainly the paprika) overlooked the oxidizing effect of the radiation, which may be due to the availability of oxygen during the E-beam treatment. Besides this, free radicals, ozone [84], and oxygen peroxide [85] are produced by radiolysis of water. These compounds are strong oxidizing agents which, in turn, could work together with the oxygen to oxidize several meat compounds, in this case the myoglobin (red), yielding traces of metmyoglobin (brown) responsible for the deeper red color of the meat. Minor changes were detected in the parameters *L** and *b** (Figure 3). All values were similar except those that corresponded to the control samples of 10 days, already discussed previously (spoiled on the 7th day) and in those treated with 2 kGy, in which the increase of the yellowness could be noted in samples stored for 10 days.

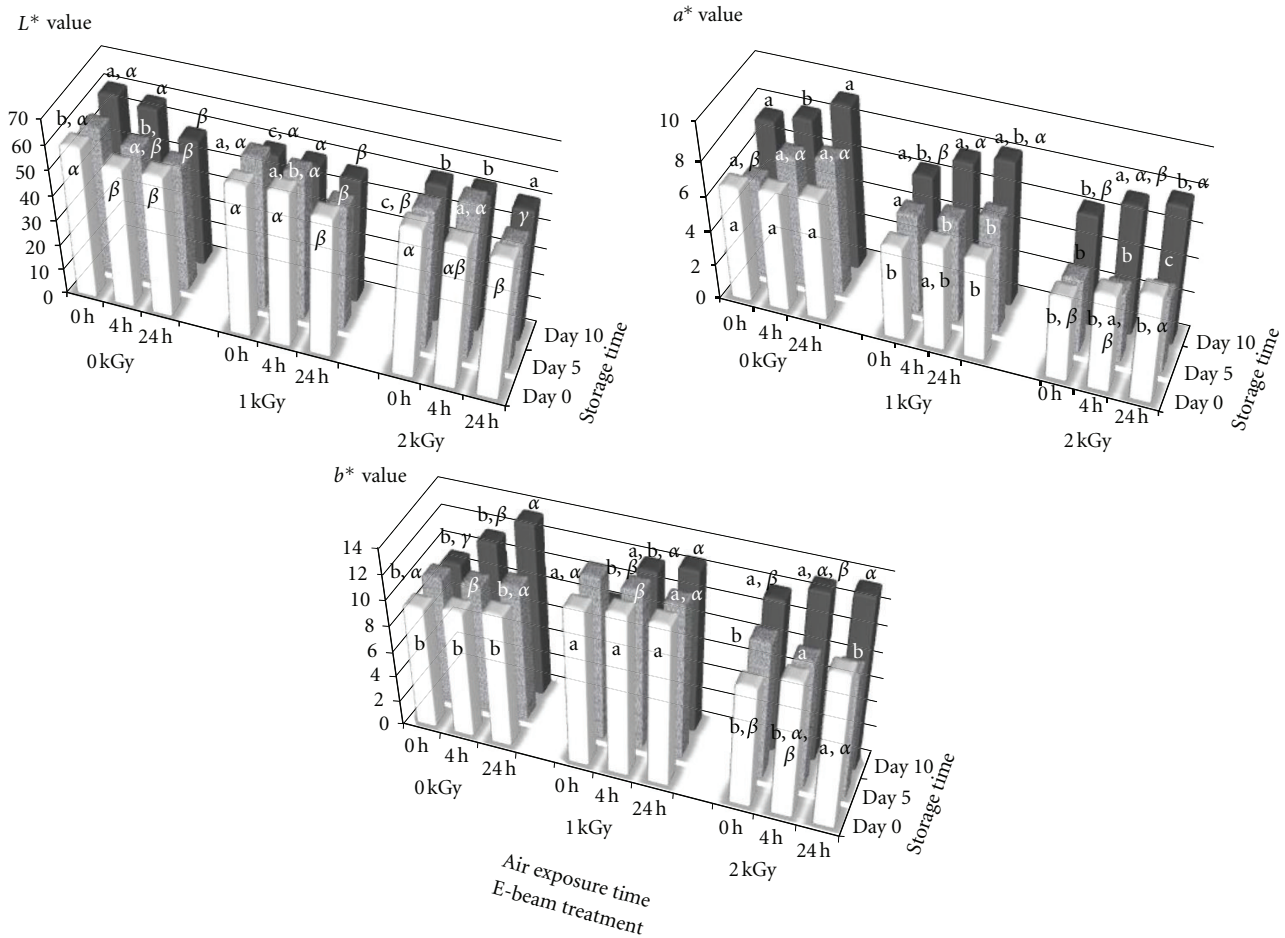


FIGURE 3: Effect of several factors (E-beam treatment, air exposure, and storage times) on the color parameters (L^* , a^* , and b^*). a, b, c in column values for storage and air exposure times with different letters are significant differences ($P < 0.05$). α , β , γ in rows values for the treatment dose and storage time with different letter are significant different ($P < 0.05$).

3.4.2. Textural and Breaking Strength. The effects of the E-beam application (1 and 2 kGy) on selected textural attributes (hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness, gumminess, chewiness, and the breaking strength) were explored. Since this product was conceived to be eaten after being cooked, the former attributes are of less concern. Briefly, no differences were found in adhesiveness, springiness, and breaking strength between control samples and those treated by E-beam. A significant difference ($P < 0.05$) was observed in the dimensionless cohesiveness (average of 6 measurements \pm standard) between samples treated with 0 and 1 kGy (0.51 ± 0.11 and 0.53 ± 0.16 , resp.) and those treated with 2 kGy (0.65 ± 0.21). The major significant difference ($P < 0.05$) was found in the hardness (average of 6 measurements \pm standard deviation) following the treatment and just after opening the bags, which was softer in control samples (21.85 ± 6.54 N) than those treated at 1 (35.83 ± 5.5 N) and 2 kGy (35.08 ± 6.23 N) although these differences disappeared after 5 days of storage at 4 or 8°C, when similar values to the control samples were achieved (average of 29.90 ± 8.95 N). Obviously, significant differences ($P < 0.05$) were also detected in the secondary attributes

(gumminess and chewiness) related to the hardness, but they disappeared after storage for a few days. In [54], an increase in hardness of cooked chicken breast treated at 2.9 kGy, due to shrinkage of the myofibrils was also reported. However, reports show that E-beam treatments at doses lower than 3 kGy did not affect the textural features of several meat products, including turkey breast rolls [86], cooked ham [34], dry ham [87], and fermented sausages [35]. These opposed differences may occur because pork loin is a raw meat, whereas the former items are transformed meat products with a higher dry matter content and, therefore, they present a more robust texture that may be less sensitive to physical technologies, such as irradiation and light pulse [37, 88]. During storage, the only clear difference observed affected adhesiveness, which increased with a longer storage time ($P < 0.05$), which is probably related with the formation of slime by the Gram-negative bacteria [69, 74]. Slight differences were occasionally found for some of the remaining attributes, but they did not follow a consistent pattern. Perhaps, the clearest one was the decrease in hardness in some samples regardless of the treatment applied, which has been attributed to the activity of endogenous proteinases.

3.4.3. Sensorial Aspects. The effects of E-beam treatment on the sensory attributes of marinated pork loin stored at 4°C was evaluated by triangular, rank order, and descriptive tests. As determined by both the triangular and the rank order tests, significant differences were obtained ($P < 0.05$) for appearance and odor in untreated (0 kGy) and E-beam treated (1 and 2 kGy) samples, immediately after treatment (0 days) and after storage at 4°C (7 days). In the descriptive analysis, the appearance of samples immediately after the E-beam and after 7 days of storage was considered to be similar in appearance to the control samples, which was in agreement with the instrumental color measurements (Figure 3). Nevertheless, at 2 kGy they were judged to be pale pink, slightly reddish-brown. However, these samples were also considered acceptable for trading. Moreover, in the descriptive analysis carried out at the end of the shelf-life of the E-beam treated samples (11 and 20 days at 1 and 2 kGy, resp.) similar color features to those mentioned above were described. Additionally, it is noteworthy, that there were no significant differences ($P > 0.05$) for appearance between untreated and treated samples when they were cooked.

In relation to the odor, in the descriptive analysis, both immediately after treatment (0 days) and after 7 days of storage at 4°C, in the raw samples treated at 1 kGy, the typical fresh marinating odor was slightly lost and a negligible odor like “scalded feather” was detected. This odor was clearer in the samples treated at 2 kGy and, additionally, slight off-odor defined as “scalded feather,” “poultry,” metallic and sulfur taints were identified. These off-odors were detected when samples were air exposed after opening the packaged bags. More than 7% of the volatiles found in irradiated foods are hydrocarbons commonly found in thermally processed and unprocessed foods [89]. Most chemical changes in irradiated meat are associated with free radical reactions [90]. The off-odors detected in the E-beam treated samples would be responsible for the lower scores assigned to the treated samples versus those that were untreated (data not shown) in the rank order text. Despite this effect, the radiated samples, even at 2 kGy, were qualified as acceptable for trading. Moreover, after 7 days of storage at 4°C, the untreated raw samples showed a slight off-odor associated with the growth of spoilage organisms and the aging of meat (pungent, sour, unpleasant). Irradiation can slightly increase levels of dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, S-methyl ester, and ethanoic acid. These sulfur compounds are highly volatile and can be eliminated by storing the irradiated meat under aerobic conditions [91]. After cooking, a slight off-odor was detected only in the samples treated at 2 kGy. These results are in agreement with the findings of other authors, who reported that cooking can reduce or eliminate irradiation-induced odor [92, 93].

In cooked samples, the flavor analysis by both the triangular and the rank order tests, significant differences ($P < 0.05$) were only found when untreated and treated samples at 2 kGy were compared just after E-beam application (data not shown). In the descriptive analysis, samples treated at 2 kGy were judged to be less juicy and had a very slight taint of “burnt,” “hot culture medium,” acids and metallic notes and negligible, astringent feel aftertaste.

It has been reported [94, 95] that postirradiation storage can allow flavor to return to the near normal features of the untreated products as the volatiles are lost. Much of the work on irradiated meat odor and flavor has targeted selected constituents, particularly lipids [96, 97]. The reactions of sulfur-containing amino acids with water radiolytic products appear to be the source of hydrogen sulfide and other volatile sulfur-containing compounds which contribute to off-flavor [98]. The literature reports that irradiation [94] increases the concentration of 3-methylbutanal and 2-methylbutanal, mainly in vacuum packaged samples. However, dimethyl disulphide levels did not differ between irradiated and untreated samples in aerobic packaging [91]. In irradiated cooked meat, a slightly higher volatile content has been found than in irradiated meat that was subsequently cooked [91].

4. Conclusions

The shelf-life of marinated pork loin slices at 4°C may be extended from 7 to 16 and 20 days with the application of 1 and 2 kGy, respectively. Likewise, there is a mild temperature abuse (increase to 8°C), the shelf-life will be extended from 5 to 10 and 16 days, respectively, when applying the same dose without compromising the sensory quality. From a hygienic point of view, E-beam treated marinated loin that is stored under refrigeration (4°C) practically guarantees a pathogen-free product during its shelf-life. Minor changes are produced in the main sensory characteristics, including the flavor of the coked product.

Acknowledgment

The present work has received financial support from Projects AGL2010-19158 and CSD 2007-00016 (CONSOLIDER INGENIO 2010) funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation.

References

- [1] M. R. McGee, K. L. Henry, J. C. Brooks, F. K. Ray, and J. B. Morgan, “Injection of sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and sodium lactate improves Warner-Bratzler shear and sensory characteristics of pre-cooked inside round roasts,” *Meat Science*, vol. 64, no. 3, pp. 273–277, 2003.
- [2] C. Prestat, J. Jensen, F. K. McKeith, and M. S. Brewer, “Cooking method and endpoint temperature effects on sensory and color characteristics of pumped pork loin chops,” *Meat Science*, vol. 60, no. 4, pp. 395–400, 2002.
- [3] P. R. Sheard and A. Tali, “Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yield and tenderness of cooked pork loin,” *Meat Science*, vol. 68, no. 2, pp. 305–311, 2004.
- [4] D. J. Vote, W. J. Platter, J. D. Tatum et al., “Injection of beef strip loins with solutions containing sodium tripolyphosphate, sodium lactate, and sodium chloride to enhance palatability,” *Journal of Animal Science*, vol. 78, no. 4, pp. 952–957, 2000.
- [5] Y. L. Xiong and D. R. Kupski, “Time-dependent marinade absorption and retention, cooking yield, and palatability of

- chicken filets marinated in various phosphate solutions," *Poultry Science*, vol. 78, no. 7, pp. 1053–1059, 1999.
- [6] J. V. Maca, R. K. Miller, M. E. Bigner, L. M. Lucia, and G. R. Acuff, "Sodium lactate and storage temperature effects on shelf life of vacuum packaged beef top rounds," *Meat Science*, vol. 53, no. 1, pp. 23–29, 1999.
 - [7] P. L. O. 'connor, M. S. Brewer, F. K. McKeith, J. E. Novakofski, and T. R. Carr, "Sodium lactate/sodium chloride effects on sensory characteristics and shelf-life of fresh ground pork," *Journal of Food Science*, vol. 58, no. 5, pp. 978–980, 1993.
 - [8] R. H. Ellegner, "Phosphates in food processing," in *Handbook of Food Additives*, pp. 644–647, 691–716, CRC Press, Cleveland, Ohio, USA, 2nd edition, 1972.
 - [9] R. N. Terrell, "Reducing the sodium content of processed meats," *Food Technology*, vol. 37, no. 7, pp. 66–71, 1983.
 - [10] P. R. Sheard, G. R. Nute, R. I. Richardson, A. Perry, and A. A. Taylor, "Injection of water and polyphosphate into pork to improve juiciness and tenderness after cooking," *Meat Science*, vol. 51, no. 4, pp. 371–376, 1999.
 - [11] S. L. Jones, R. Carr, and F. K. McKeith, "Palatability and storage characteristics of precooked pork roast," *Journal of Food Science*, vol. 52, no. 2, pp. 279–281, 1987.
 - [12] L. A. Smith, S. L. Simmons, F. K. McKeith, P. J. Bechtel, and L. Bradley, "Effects of sodium tripolyphosphate on physical and sensory properties of beef and pork roasts," *Journal of Food Science*, vol. 49, no. 6, pp. 1636–1637, 1984.
 - [13] W. T. Banks, C. Wang, and M. S. Brewer, "Sodium lactate/sodium tripolyphosphate combination effects on aerobic plate counts, pH and color of fresh pork longissimus muscle," *Meat Science*, vol. 50, no. 4, pp. 499–504, 1998.
 - [14] J. A. Carpenter, R. L. Saffle, and L. D. Kamstra, "Tenderization of beef by prerigor infusion of a chelating agent," *Food Technology*, vol. 15, no. 4, pp. 197–198, 1961.
 - [15] R. J. Krause, H. W. Ockerman, B. Krol, P. C. Moerman, and J. R. Plimpton, "Influence of tumbling, tumbling time, trim and sodium tripolyphosphate on quality and yield of cured hams," *Journal of Food Science*, vol. 43, no. 3, pp. 853–855, 1978.
 - [16] J. M. Jay, M. J. Loessner, and D. A. Golden, *Modern Food Microbiology*, Springer, New York, NY, USA, 7th edition, 2005.
 - [17] J. Cervený, J. Meyer, and P. A. Hall, "Microbiological spoilage of meat and poultry products," in *Food Microbiology and Safety*, P. Doyle, Ed., pp. 69–86, Springer, New York, NY, USA, 2009.
 - [18] R. H. Dainty and B. M. Mackey, "The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes," *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, vol. 73, no. S21, pp. 103s–114s, 1992.
 - [19] P. M. Nothingham, "Microbiology of carcass meats," in *Meat Microbiology*, M. H. Brown, Ed., pp. 13–16, Applied Science, London, UK, 1982.
 - [20] C. O. Gill, "The microbiology of chilled meat storage," in *Proceedings of the 24th Meat Industry Research Conference*, vol. 852, pp. 210–213, Mirinz, Hamilton, New Zealand, 1986.
 - [21] J. C. Ayres, "Temperature relationships and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef," *Food Research*, vol. 25, no. 1, pp. 1–18, 1960.
 - [22] M. Ingram and R. H. Dainty, "Symposium on microbial changes in foods. Changes caused by microbes in spoilage of meats," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 34, no. 1, pp. 21–39, 1971.
 - [23] J. Björkroth, "Microbiological ecology of marinated meat products," *Meat Science*, vol. 70, no. 3, pp. 477–480, 2005.
 - [24] C. Jo, N. Y. Lee, H. J. Kang, D. H. Shin, and M. W. Byun, "Inactivation of foodborne pathogens in marinated beef rib by ionizing radiation," *Food Microbiology*, vol. 21, no. 5, pp. 543–548, 2004.
 - [25] J. R. Junttila, S. I. Niemela, and J. Hirn, "Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 65, no. 4, pp. 321–327, 1988.
 - [26] International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), "Microbiological specifications of food pathogens," in *Microorganisms in Foods 5*, Blackie Academic and Professional, London, UK, 1996.
 - [27] J. Y. D'Aoust and J. Maurer, "*Salmonella* species," in *Food Microbiology Fundamental and Frontiers*, M. P. Doyle and R. B. Larry, Eds., pp. 190–192, ASM Press, Washington, DC, USA, 3rd edition, 2007.
 - [28] J. Meng, M. P. Doyle, T. Zhao, and S. Ahao, "Enterohemorrhagic *Escherichia coli*," in *Food Microbiology Fundamental and Frontiers*, M. P. Doyle and R. B. Larry, Eds., pp. 251–252, 3rd edition, 2007.
 - [29] R. T. Parry, *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, Glasgow, UK, 1993.
 - [30] I. Garcia-Marquez, M. I. Cambero, J. A. Ordóñez, and M. C. Cabeza, "Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment," *Journal of Food Protection*. In press.
 - [31] M. R. S. Clavero, J. D. Monk, L. R. Beuchat, M. P. Doyle, and R. E. Brackett, "Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, salmonellae, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 6, pp. 2069–2075, 1994.
 - [32] R. L. Buchanan, S. G. Edelson, K. Snipes, and G. Boyd, "Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by irradiation," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 11, pp. 4533–4535, 1998.
 - [33] R. R. O. Chirinos, D. M. Vizeu, M. T. Destro, B. D. G. M. Franco, and M. Landgraf, "Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers by gamma irradiation," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 33, no. 1, pp. 53–56, 2002.
 - [34] M. Concepción Cabeza, I. Cambero, L. de la Hoz, and J. A. Ordóñez, "Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 8, no. 2, pp. 299–305, 2007.
 - [35] M. C. Cabeza, L. de la Hoz, R. Velasco, M. I. Cambero, and J. A. Ordóñez, "Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation," *Meat Science*, vol. 83, no. 2, pp. 320–327, 2009.
 - [36] M. C. Cabeza, M. I. Cambero, M. Núñez, M. Medina, L. de la Hoz, and J. A. Ordóñez, "Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham," *Food Microbiology*, vol. 27, no. 6, pp. 777–782, 2010.
 - [37] M. I. Cambero, M. C. Cabeza, R. Escudero et al., "Sanitation of selected ready-to-eat (RTE) intermediate moisture foods (IMF) of animal origin by E-beam irradiation," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 9, no. 7, pp. 594–599, 2012.
 - [38] T. Radomyski, E. A. Murano, D. G. Olson, and P. S. Murano, "Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: a review," *Journal of Food Protection*, vol. 57, no. 1, pp. 73–86, 1994.
 - [39] American Society for Testing and Materials (ASTM), "E1650-97e1 standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems," vol. 12.02, 2000.

- [40] T. A. Roberts, C. R. Britton, and W. R. Hudson, "The bacteriological quality of minced beef in the U.K.," *Journal of Hygiene*, vol. 85, no. 2, pp. 211–217, 1980.
- [41] G. Sundheim, A. Sletten, and R. H. Dainty, "Identification of pseudomonads from fresh and chill-stored chicken carcasses," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 39, no. 3, pp. 185–194, 1998.
- [42] D. R. Pelinescu, E. Sasarman, M. C. Chifiriuc et al., "Isolation and identification of some *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains by a polyphasic taxonomical approach," *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 14, no. 2, pp. 4225–4233, 2009.
- [43] S. Chooklin, L. Kaewsichan, and J. Kaewsrichan, "Potential use of *Lactobacillus casei* TISTR, 1500 for the bioconversion of palmyra sap to lactic acid," *Journal of Sustainable Energy and Environment*, vol. 2, pp. 83–87, 2011.
- [44] J. Baranyi, "Mathematics of predictive food microbiology," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 26, no. 2, pp. 199–218, 1995.
- [45] R. G. Kauffman, G. Eikelenboom, P. G. van der Wal, G. Merkus, and M. Zaar, "The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature," *Meat Science*, vol. 18, no. 3, pp. 191–200, 1986.
- [46] K. O. Honikel, "Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat," *Meat Science*, vol. 49, no. 4, pp. 447–457, 1998.
- [47] A. M. Herrero, J. A. Ordóñez, R. de Avila, B. Herranz, L. de la Hoz, and M. I. Cambero, "Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics," *Meat Science*, vol. 77, no. 3, pp. 331–338, 2007.
- [48] International Organization for Standardization (ISO), "Analyze sensorielle. Guide pour l'implantation d'un local destiné aux analyses sensorielles," ISO/DP 66.58, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1981.
- [49] J. Benedito, M. I. Cambero, C. Ortuño, M. C. Cabeza, J. A. Ordóñez, and L. de la Hoz, "Modeling and optimization of sensory changes and shelf-life in vacuum-packaged cooked ham treated by E-beam irradiation," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 80, no. 3, pp. 505–513, 2011.
- [50] S. Lebepe, R. A. Molins, S. P. Charden, H. Farrar, and R. P. Skowronski, "Changes in microflora and other characteristics in vacuum packed pork loins irradiated at 3.0 kGy," *Journal of Food Science*, vol. 55, no. 4, pp. 918–924, 1990.
- [51] A. D. Lambert, J. P. Smith, and K. L. Dodds, "Physical, chemical and sensory changes in irradiated fresh pork packaged in modified atmosphere," *Journal of Food Science*, vol. 57, no. 6, pp. 1294–1299, 1992.
- [52] P. Y. Y. Wong, A. N. Wijewickreme, and D. D. Kitts, "Fat content and ascorbic acid infusion influence microbial and physicochemical qualities of electron beam irradiated beef patties," *Food Chemistry*, vol. 89, no. 1, pp. 93–102, 2005.
- [53] B. J. Shay, A. F. Egan, and P. A. Wills, "The use of irradiation for extending the storage life of fresh and processed meats," *Food Technology in Australia*, vol. 40, pp. 310–313, 1988.
- [54] K. S. Yoon, "Effect of gamma irradiation on the texture and microstructure of chicken breast meat," *Meat Science*, vol. 63, no. 2, pp. 273–277, 2003.
- [55] R. A. Edwards, R. H. Dainty, C. M. Hibbard, and S. V. Ramantanis, "Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 63, no. 5, pp. 427–434, 1987.
- [56] O. Sørheim, H. Nissen, and T. Nesbakken, "The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide," *Meat Science*, vol. 52, no. 2, pp. 157–164, 1999.
- [57] M. L. García-López, M. Prieto, and A. Otero, "The physiological attributes of gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products," in *The Microbiology of Meat and Poultry*, A. Davis and R. Board, Eds., pp. 1–34, Academic and Professional, London, UK, 1998.
- [58] J. G. Niemand, H. J. van der Linde, and W. H. Holzapfel, "Shelf-life extension of minced beef through combined treatment involving radiation," *Journal of Food Protection*, vol. 46, pp. 791–796, 1983.
- [59] R. Velasco, J. A. Ordóñez, M. C. Cabeza, L. de la Hoz, and M. I. Cambero, "Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese," *International Dairy Journal*, vol. 21, no. 7, pp. 493–500, 2011.
- [60] J. S. Aguirre, M. R. Rodríguez, and G. D. García de Fernando, "Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 149, no. 3, pp. 236–246, 2011.
- [61] I. R. Grant and M. F. Patterson, "Sensitivity of foodborne pathogens to irradiation in the components of a chilled ready meal," *Food Microbiology*, vol. 9, no. 2, pp. 95–103, 1992.
- [62] A. F. Mendonca, M. G. Romero, M. A. Lihono, R. Nannapaneni, and M. G. Johnson, "Radiation resistance and virulence of *Listeria monocytogenes* Scott A following starvation in physiological saline," *Journal of Food Protection*, vol. 67, no. 3, pp. 470–474, 2004.
- [63] Y. A. El-Zawahry and D. B. Rowley, "Radiation resistance and injury of *Yersinia enterocolitica*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 37, no. 1, pp. 50–54, 1979.
- [64] E. H. Kampelmacher, "Irradiation for control of *Salmonella* and other pathogens in poultry and fresh meats," *Food Technology*, vol. 37, pp. 117–119, 1983.
- [65] M. Patterson, "Sensitivity of bacteria to irradiation on poultry meat under various atmospheres," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 7, no. 3, pp. 55–58, 1988.
- [66] V. Ananth, J. S. Dickson, D. G. Olson, and E. A. Murano, "Shelf life extension, safety, and quality of fresh pork loin treated with high hydrostatic pressure," *Journal of Food Protection*, vol. 61, no. 12, pp. 1649–1656, 1998.
- [67] J. Billing and P. W. Sherman, "Antimicrobial functions of spices: why some like it hot," *Quarterly Review of Biology*, vol. 73, no. 1, pp. 3–49, 1998.
- [68] L. L. Zaika, J. C. Kissinger, and A. E. Wasserman, "Inhibition of lactic acid bacteria by herbs," *Journal of Food Science*, vol. 48, no. 5, pp. 1455–1459, 1983.
- [69] R. H. Dainty, B. G. Shaw, and T. A. Robert, "Microbial and chemical changes in chill-stored red meats," in *Food Microbiology: Advances and Prospects*, T. A. Roberts and F. A. Skinner, Eds., pp. 151–178, Academic Press, London, UK, 1983.
- [70] M. A. Asensio, J. A. Ordóñez, and B. Sanz, "Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf life of refrigerated pork packed in plastic bags," *Journal of Food Protection*, vol. 51, pp. 356–360, 1988.
- [71] B. Y. Johnson, "Chilled vacuum-packed meat," *CSIRO Food Research*, vol. 34, pp. 14–21, 1974.
- [72] P. N. Church, "Meat and meat products," in *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging*, R. T. Parry, Ed., pp. 170–187, Blackie, Glasgow, UK, 1993.

- [73] B. C. Schirmer, E. Heir, and S. Langsrud, "Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 106, no. 6, pp. 2106–2116, 2009.
- [74] C. O. Gill and K. G. Newton, "The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 43, no. 2, pp. 189–195, 1977.
- [75] B. M. Mackey, T. A. Roberts, J. Mansfield, and G. Farkas, "Growth of *Salmonella* on chilled meat," *Journal of Hygiene*, vol. 85, no. 1, pp. 115–124, 1980.
- [76] S. J. Walker, P. Archer, and J. G. Banks, "Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 68, no. 2, pp. 157–162, 1990.
- [77] A. E. Hashisaka, S. D. Weagant, and F. M. Dong, "Survival of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation," *Journal of Food Protection*, vol. 52, pp. 490–492, 1989.
- [78] C. N. Huhtanen, R. K. Jenkins, and D. W. Thayer, "Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*," *Journal of Food Protection*, vol. 52, pp. 610–613, 1989.
- [79] Food and Drug Administration (FDA) and U.S. Food Safety and Inspection Service, "Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods," Docket No. 1999N-1168, vols. 23–28, 2003.
- [80] International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), "Microbiological testing in food safety management," in *Microorganisms in Foods 7*, pp. 313–332, Kluwer Academic, Plenum Publishers & Hall, New York, NY, USA, 2002.
- [81] R. S. Hendriksen, A. R. Vieira, S. Karlsmose et al., "Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 8, no. 8, pp. 887–900, 2011.
- [82] D. W. Thayer, G. Boyd, W. S. Muller, C. A. Lipson, W. C. Hayne, and S. H. Baer, "Radiation resistance of *Salmonella*," *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 5, no. 6, pp. 383–390, 1990.
- [83] G. J. E. Nychas, P. N. Skandamis, C. C. Tassou, and K. P. Koutsoumanis, "Meat spoilage during distribution," *Meat Science*, vol. 78, no. 1-2, pp. 77–89, 2008.
- [84] D. G. Olson, "Irradiation of food," *Food Technology*, vol. 52, no. 1, pp. 56–62, 1998.
- [85] K. D. Whitburn, J. J. Shieh, R. M. Sellers, M. Z. Hoffman, and I. A. Taub, "Redox transformations in ferrimyoglobin induced by radiation-generated free radicals in aqueous solution," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 257, no. 4, pp. 1860–1869, 1982.
- [86] E. J. Lee and D. U. Ahn, "Quality characteristics of irradiated turkey breast rolls formulated with plum extract," *Meat Science*, vol. 71, no. 2, pp. 300–305, 2005.
- [87] L. Hoz, M. I. Cambero, M. C. Cabeza, A. M. Herrero, and J. A. Ordóñez, "Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam radiation," *Journal of Food Protection*, vol. 71, no. 10, pp. 2001–2006, 2008.
- [88] E. Hierro, E. Barroso, L. de la Hoz, J. A. Ordóñez, S. Manzano, and M. Fernández, "Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 12, no. 3, pp. 275–281, 2011.
- [89] W. W. Nawar, R. Zhu, and Y. J. Yoo, "Radiolytic products of lipids as markers for the detection of irradiated foods," in *Food Irradiation and the Chemistry*, D. E. Johnston and M. H. Stevenson, Eds., Special Publication 86, pp. 13–24, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1990.
- [90] D. U. Ahn and E. J. Lee, "Mechanisms and prevention of off-odor production and color change," in *Irradiation of Food and Packaging: Recent Developments*, V. Komolprasert and K. Morehouse, Eds., vol. 875 of *ACS Symposium Series*, pp. 43–76, American Chemical Society, Oxford, UK, 2004.
- [91] M. Du, S. J. Hur, and D. U. Ahn, "Raw-meat packaging and storage affect the color and odor of irradiated broiler breast fillets after cooking," *Meat Science*, vol. 61, no. 1, pp. 49–54, 2002.
- [92] M. L. Lacroix, W. Smoragiewicz, M. Jobin, B. Latreille, and K. Krzystyniak, "The effect of irradiation of fresh pork loins on the protein quality and microbiological changes in aerobically or vacuum-packaged," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 63, no. 3–6, pp. 317–322, 2002.
- [93] S. E. Luchsinger, D. H. Kropf, C. M. García Zepeda et al., "Sensory analysis and consumer acceptance of irradiated boneless pork chops," *Journal of Food Science*, vol. 61, no. 6, pp. 1261–1266, 1996.
- [94] M. Du and D. U. Ahn, "Effect of antioxidants on the quality of irradiated sausages prepared with turkey thigh meat," *Poultry Science*, vol. 81, no. 8, pp. 1251–1256, 2002.
- [95] W. Huber, A. Brasch, and A. Waly, "Effect of processing conditions and organoleptic changes in foodstuffs sterilized with high intensity electrons," *Food Technology*, vol. 7, pp. 109–115, 1953.
- [96] D. U. Ahn, D. G. Olson, C. Jo, J. Love, and S. K. Jin, "Volatiles production and lipid oxidation in irradiated cooked sausage as related to packaging and storage," *Journal of Food Science*, vol. 64, no. 2, pp. 226–229, 1999.
- [97] M. S. Brewer, "Irradiation effects on meat flavor: a review," *Meat Science*, vol. 81, no. 1, pp. 1–14, 2009.
- [98] C. Jo and D. U. Ahn, "Production of volatile compounds from irradiated oil emulsion containing amino acids of proteins," *Journal of Food Science*, vol. 65, no. 4, pp. 612–616, 2000.

ARTÍCULO 3

Changes in the phospholipid fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage

Aceites y grasas. 2013. 64(1): 7-14

INVESTIGACIÓN

Changes in the phospholipid fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage

By I. García-Márquez^b, M. Narváez-Rivas^a, E. Gallardo^a, C.M. Cabeza^b and M. León-Camacho^{a, *}

^a Food Characterization and Quality Department. Instituto de la Grasa (C.S.I.C.).
Avda. Padre García Tejero, 4. 41012 Seville, Spain

^b Department of Nutrition, Bromatology and Food Technology Faculty of Veterinary, University Complutense,
Avda. Puerta de Hierro, S/N, E-28040 Madrid, Spain

* Corresponding author: mleon@cica.es

RESUMEN

Cambio en la fracción de fosfolípidos de la grasa intramuscular del lomo de cerdo (fresco y adobado) con diferentes irradiaciones y empaquetados durante el almacenamiento

Se ha realizado un estudio sobre el efecto de la radiación de electrones (E-beam) (1 y 2 kGy) en las clases de fosfolípidos del lomo de cerdo almacenado a 4 y 8 °C bajo diferentes atmósferas (aire, vacío y dióxido de carbono). Este tipo de estudio ha sido llevado a cabo por primera vez en este tipo de muestras. El tratamiento estadístico combinado de distintas variables muestran que se producen cambios menores en los fosfolípidos individuales sujetos a las diferentes condiciones seleccionadas (la cardiolipina y la esfingomielina se ven afectadas por el tipo de lomo, la cardiolipina por la temperatura de almacenamiento y la fosfatidiletanolamina por las atmósferas modificadas). El resultado más relevante fue que no hubo efecto de la dosis de radiación en las diferentes clases de fosfolípidos, por lo que la radiación E-beam se convierte en una herramienta útil para prolongar la vida útil de la carne fresca sin producir cambios en la fracción de fosfolípidos de ésta.

PALABRAS CLAVE: Adobado – Clases de fosfolípidos – E-beam – Empaquetado – Fresco – HPLC – Lomo de cerdo – Radiación.

SUMMARY

Changes in the phospholipid fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage

A study on the effect of E-beam (1 and 2 kGy) on the phospholipid classes of fresh and marinated pork loin stored at 4°C and 8°C under different atmospheres (air, vacuum and carbon dioxide enriched atmospheres) has been conducted. This is the first time that a study of this kind has been carried out on these types of samples. The combined statistical treatment of the distinct variables shows that minor changes (cardiolipin and sphingomyelin between both types of loin, cardiolipin vs storage temperatures and phosphatidylethanolamine vs the modified atmospheres) are produced in the individual phospholipids subjected to the different selected conditions. The more relevant result was

that no effect of the irradiation doses on the phospholipids classes was found, so the E-beam can be considered a useful tool to extend the shelf-life of fresh meat without changes in the phospholipid fraction.

KEY-WORDS: E-beam – Fresh – HPLC – Irradiation – Marinated – Packaging – Phospholipid classes – Pork loin.

1. INTRODUCTION

According to FAO statistics, pork is the most widely produced meat in the world. Europe ranks second in the production of pigs and pig meat, and its production represents 22.6% of the total. The European Union reported a consumption of about 20 million metric tons in the year 2004 (Ministerio de Comercio Exterior, 2007). In Spain, the porcine sector is the principal group; with a consumption of pigs' meat of about 62 kg / per capita / year, well above other meats, both red and white (MARM, 2000). This acceptance is due to its sensory characteristics, which are conferred by their lipid composition, mainly the products from the Iberian bred (an indigenous, black footed, fine skeleton and long legged breed with adipogenic ability). Most of the aroma compounds of raw and cooked meat arise from lipid oxidation during storage and processing (Gandemer, 2002). Lipid content has often been reported to influence the sensory traits of texture, tenderness, flavor, and juiciness (Candek-Potokar *et al.*, 1998; Lonergan *et al.*, 2001; Huff-Lonergan *et al.*, 2002; Gandemer, 2002).

Food irradiation is a physical process for food preservation based on the application of radiation associated with enough energy to separate electrons from molecules in food, turning them into ions. It is a technology which has been well-known since the 1980's, but hardly used because it cannot compete with heat treatments. However, it has been observed that some of the forms of radiation, namely accelerated electrons (E-beam), present a

good opportunity for extending the shelf-life of meat pieces for distribution to large distances, minimizing, at the same time, cross contamination. Likewise, the E-beam treatment has been ascertained to be very useful for sanitizing ready-to-eat foods (RTE), including pork products (Cabeza *et al.*, 2007; Hoz *et al.*, 2008; Cabeza *et al.*, 2009) since it is not possible to apply a heat treatment to already packed RTE foods. The efficacy of ionizing radiation to prevent or delay the food spoilage and eliminate vegetative pathogen organisms has been well established. It has been reported to increase shelf life (Mitchell, 1994) with a 0.25 to 1 kGy dose under aerobic conditions, although adverse effects may be produced (vitamin destruction, accelerated lipolytic rancidity, formation of free radicals). To support this view, we may cite the wide optimization program that the Thayer's group in the USA has been developing since 1995, aimed at achieving this goal for beef and pork (Thayer *et al.*, 1993). Recently, it has been demonstrated that E-beam is a very useful procedure to both extend the shelf-life and to reach the objective of Food Safety (FSO) in a variety of RTE products. However, some researchers have suggested (Ahn *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2002; Patterson and Stevenson, 1995) that the use of this technology in meat products is limited because of the resulting changes in the aroma, color and flavor, which can significantly affect consumer acceptance. Radiation could accelerate oxidation reactions and it may produce undesirable compounds (Chen *et al.*, 1999; Groninger *et al.*, 1956; Lambert *et al.*, 1992; Lefebvre *et al.*, 1994; Thayer *et al.*, 1993).

Nowadays, some of the most prevalent food preservation technologies are modified atmosphere packaging (MAP) and vacuum packaging. Modified atmosphere packaging consists of changing the gas atmosphere in the product's environment. It extends the shelf-life of raw meat and fish by suppressing or slowing down the growth of gram-negative psychrotrophic bacteria, mainly *Pseudomonas* spp. and other Gram-negative organisms, which cause rapid spoilage of food aerobically stored as a result of the accumulation of end products from metabolism (Church and Parsons, 1995; Livingston *et al.*, 2004). Vacuum packaging decreased the micro-biological diversity in chilled pork during storage, with the lactic acid bacteria (LAB) being the dominant organism, which grows slower than the aerobic Gram-negative, resulting in an extension of the shelflife (Dainty and Mackey, 1992; Olsson *et al.*, 2003). Some of the compounds that may be affected by the type of packaging or irradiation could be the phospholipids (PL), which are integral compounds of cell membranes in animal and plant tissues. They are involved in the functioning of cell membranes and in their ability to interact with metabolites, ions, hormones, antibodies and other cells (Cambero *et al.*, 1991; Weihrauch and Son, 1983). One of the most important factors in lipid composition is the amount of intramuscular phospholipids in the meat for the flavor and nutritive quality of meat products (Ali *et al.*, 2007; Choi, 2009; García *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 2008).

Several authors have investigated the degree of lipid oxidation through the determination of volatile compounds. The Maillard reaction system containing phospholipids produced many lipid-derived volatile compounds which give fatty aromas to cooked meat and the characteristic coming from the interaction of the Maillard reaction and lipids (Chiu *et al.*, 1990; Mottram and Whitfield, 1995). Volatile compounds produced during the FeCl₃-sodium ascorbate-catalyzed oxidation of phospholipids and extracted from pork muscle by high-performance liquid chromatography were checked by Meynier *et al.* (1998). The flavor contribution of triglycerides and phospholipids to pork was also studied, showing that the flavor differences between two different breeds and two different defatting treatments (removing intramuscular triglycerides or total lipids) (Huang *et al.*, 2010). Finally, an analytical method for the isolation, resolution and quantification of phospholipid classes applicable to different types of matrices, has been developed in another study. This method has been applied to subcutaneous fat from the Iberian pig (Narváez-Rivas *et al.*, 2011), analyzing the different phospholipid classes by HPLC.

The aim of this work is to study for the first time the modification produced in the different phospholipid classes from fat extracted from fresh and marinated pork loin slices subjected to E-beam irradiation once packed under different atmospheres. As control, non-irradiated samples were used.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents and standards

Hexane, a fraction from petroleum, Multisolvant TM HPLC ACS grade supplied by Scharlau (Barcelona, Spain) was distilled through a fractionation column. Chloroform, methanol, diethyl ether, ammonia solution and 2-propanol for analysis grade were provided by Merck (Darmstadt, Germany). A phospholipid standard solution (ref: P3817-1VL) containing phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine, (PC) phosphatidylinositol, (PI), phosphatidylserine (PS), and lysophosphatidylcholine (LPC) was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Triethylamine, cardiolipin (CL) and sphingomyelin (SPH) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and were used as standard. Chloroform and methanol, both LiChrosolv grade, were supplied by Merck (Darmstadt, Germany) and were used as HPLC solvents. All other materials were analytical grade.

2.2. Samples and Sample treatment

A total of fifty-four samples of fresh and marinated (prepared by injection of a brine composed of salt, ascorbic acid, nitrite, garlic, paprika and others) loin from castrated male white pigs were used. Table 1 shows the E-beam treatment applied and the identification code

Table 1
Intramuscular fat from pork loin samples

Code	Type	Temperature (°C)	Atmosphere	Radiation (kGy)	Time (days)
1F	Fresh	4	Air	0	0
2F	Fresh	4	Air	1	0
3F	Fresh	4	Air	2	0
4F	Fresh	4	Vacuum	0	0
5F	Fresh	4	Vacuum	1	0
6F	Fresh	4	Vacuum	2	0
7F	Fresh	4	MAP	0	0
8F	Fresh	4	MAP	1	0
9F	Fresh	4	MAP	2	0
10F	Fresh	4	Air	0	10
11F	Fresh	4	Air	1	10
12F	Fresh	4	Air	2	10
13F	Fresh	4	Vacuum	0	10
14F	Fresh	4	Vacuum	1	10
15F	Fresh	4	Vacuum	2	10
16F	Fresh	4	MAP	0	10
17F	Fresh	4	MAP	1	10
18F	Fresh	4	MAP	2	10
19F	Fresh	8	Air	0	10
20F	Fresh	8	Air	1	10
21F	Fresh	8	Air	2	10
22F	Fresh	8	Vacuum	0	10
23F	Fresh	8	Vacuum	1	10
24F	Fresh	8	Vacuum	2	10
25F	Fresh	8	MAP	0	10
26F	Fresh	8	MAP	1	10
27F	Fresh	8	MAP	2	10
1M	Marinated	4	Air	0	0
2M	Marinated	4	Air	1	0
3M	Marinated	4	Air	2	0
4M	Marinated	4	Vacuum	0	0
5M	Marinated	4	Vacuum	1	0
6M	Marinated	4	Vacuum	2	0
7M	Marinated	4	MAP	0	0
8M	Marinated	4	MAP	1	0
9M	Marinated	4	MAP	2	0
10M	Marinated	4	Air	0	10
11M	Marinated	4	Air	1	10
12M	Marinated	4	Air	2	10
13M	Marinated	4	Vacuum	0	10
14M	Marinated	4	Vacuum	1	10
15M	Marinated	4	Vacuum	2	10
16M	Marinated	4	MAP	0	10
17M	Marinated	4	MAP	1	10
18M	Marinated	4	MAP	2	10
19M	Marinated	8	Air	0	10
20M	Marinated	8	Air	1	10
21M	Marinated	8	Air	2	10
22M	Marinated	8	Vacuum	0	10
23M	Marinated	8	Vacuum	1	10
24M	Marinated	8	Vacuum	2	10
25M	Marinated	8	MAP	0	10
26M	Marinated	8	MAP	1	10
27M	Marinated	8	MAP	2	10

assigned to each one. The lipids were obtained from 10 grams of each sample by extraction with chloroform-methanol (2:1 v/v) according to the procedure described by Folch *et al.* (1957). The samples were cut up into small pieces and homogenized before extraction with 3×50 mL of solvent, then 100 mL of distilled water were added. The chloroform solution was filtered over anhydrous sodium sulphate, and the samples were extracted with 3×50 mL of diethyl ether. The extracts were combined with the chloroform solution and then evaporated to dryness in a rotary evaporator at 30°C under reduced pressure. The phospholipid fraction was separated from the extracted lipids by means of Solid Phase Extraction (SPE) according to the method of Narváez-Rivas *et al.* (2011). An aliquot (200 mg) of the lipid extract was dissolved in 1.0 mL of hexane and then transferred into a silica gel bonded column, Supelclean LC-Si, 6 mL volume; 1 g sorbent (Supelco Bellefonte, PA, USA) which was previously conditioned with 10 mL n-hexane. The column was washed with 10 mL n-hexane:diethyl ether (4:1 v/v), to remove free fatty acids, and then hydrocarbons, cholesterol esters and triacylglycerols were eluted with 18 mL of chloroform:2-propanol (2:1 v/v). The phospholipids were recovered with 10 mL of methanol and finally washed with a 10 mL solution of methanol:chloroform:water (5:3:2 v/v/v). The recovered fraction was evaporated to dryness in a rotary evaporator at 30°C under reduced pressure and the residue was re-dissolved in 0.2 mL of chloroform for the HPLC analysis.

2.3. Analysis of phospholipids

The different phospholipid classes were analyzed by HPLC according to the method previously described (Narváez-Rivas *et al.*, 2011). The HPLC system consisted of an Agilent (Palo Alto, CA, USA) 1100 liquid chromatograph with a quaternary pump, an autosampler with variable injection volume (0 to 100 μ L), a Peltier furnace and an evaporative light scattering detector Alltech ELSD 2000 (Deerfield, IL, USA). A Chemical Station HP was used for controlling and monitoring the system. Separation was performed in a 100×4.6 mm macropores size 2.1 μ m and mesopores size 13 nm Chromolith Performance Si column Merck (Darmstadt, Germany). The temperature of the column was held at 25°C. A gradient elution was carried out using different ratios of solutions A (chloroform:methanol:ammonia solution, 80:19.5:0.5, v/v/v) and B (chloroform:methanol:triethylamine:water, 69.53:25.58:0.49:4.40, v/v/v/v). The best separation was obtained using the following gradient: from 0 to 5 min, B was increased from 0% to 40%; from 5 to 7 min; B was kept constant at 40%; from 7 to 13 min and was increased from 40% to 100%; from 13 to 20 min B was kept constant at 100%; from 20 to 25 min B was decreased from 100% to 0%; a post-run time of 5 min was done to equilibrate the column before

the next injection. The flow rate was maintained at 1 mL min⁻¹ for 25 min and the injection volume was 50 μ L. The evaporative light scattering detector used nitrogen as the nebulizing gas. The optimal detector conditions were at 1.5 L min⁻¹ and 110°C.

2.4. Quantitative analysis and statistical treatment

Six phospholipid classes were identified. The peak area of each phospholipid class was used as an analytical signal. The quantification of each different phospholipid class was carried out using a calibration curve by injecting standard solutions of the different species identified. A representative chromatogram report of phospholipid classes from intramuscular fat and the corresponding peak identifications are shown in Figure 1.

The phospholipid classes identified were considered as chemical descriptors. A data matrix, whose rows are the samples and whose columns are the variables, was built. Each element of this matrix x_{ij} corresponds to the content of phospholipid j for the sample i . Statistical analysis based on non-parametric techniques were used, including the Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors test, which was used to evaluate the normality of each variable included in the study. Since the data distribution was not normal, non-parametric tests were applied. The Kruskal-Wallis test was used to find out significant differences for the variables with three levels. This test is a one way analysis of variance by ranks, i.e., the nonparametric equivalence of one way ANOVA. Kruskal-Wallis test calculates the H parameter for comparison with the chi-squared distribution for $n-1$ degrees of freedom and $p = 0.05$, where n is the number of groups being considered. When significant differences are detected, a post hoc comparison highlights the pairs of groups responsible for those differences. The Mann-Whitney U test was used to determinate the differences between two levels of the same variable. This test is the nonparametric alternative to the t-Student test for independent means. The statistical parameter U was obtained for each compound, and the respective z values were calculated to be compared with the z value

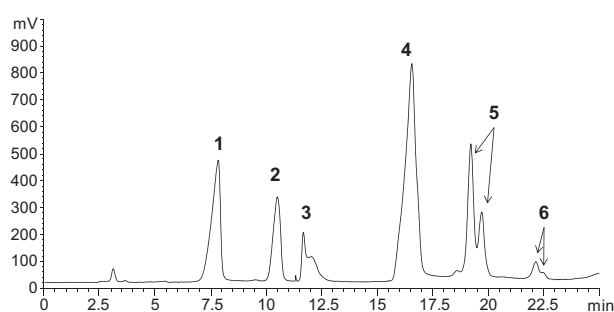


Figure 1
HPLC chromatogram of phospholipid fractions of intramuscular fat from pork loin. 1: Cardiolipin; 2: phosphatidylethanolamine; 3: phosphatidylinositol; 4: phosphatidylcholine; 5: sphingomyelin; 6: lysophosphatidylcholine.

in the normalized standard distribution. The calculations were made using the statistical package CSS: STATISTICA from StatsoftTM (Tulsa, OK, USA).

3. RESULTS

Table 2 shows the mean and standard deviation values (ng g^{-1} of fat and relative percentage of total phospholipid fraction) for the phospholipid classes determined in the analyzed fat samples grouped according to the two types of loin (fresh and marinated). The profile obtained for the different classes of phospholipids in fresh loin is in good agreement with those reported by other authors except for SPH (7.19%), which was greater than that described in the literature (1.8%) (Meynier *et al.*, 1998) and the LPC (2.84%), which is rarely described in this type of samples (Kuchmak and Dugan, 1963). Although it has been found by other authors in pork (Boselli *et al.*, 2008) and in the muscle of other animals, namely rabbit (Cambero *et al.*, 1991), PS was not detected. The averages and ranges of all the samples and groups of fresh and marinated pork loin are included in Table 3. Evidently, the most abundant phospholipid class was PC, with average values of 23.73 ng g^{-1} . The other major phospholipid was PE with an average value of 9.44 ng g^{-1} . CL, PI, SPH and LPC

presented concentrations in the range of $1.03\text{--}2.45 \text{ ng g}^{-1}$. In the case of PE, PI, PC, SPH and LPC, samples obtained from fresh loin presented higher average values than those from marinated loin. The CL content was, however, higher in marinated loin. In order to determine significant differences between the two types of loin, the Mann-Whitney U test was performed. The statistical parameter U was obtained for each compound and the respective z-values were calculated for comparison with the z-value in the normalized standard distribution for 95% confidence ($z = 1.96$). The results of this test are also shown in table 3. It can be observed that the obtained z-values were higher than the critical one for all of the variables considered. The greatest differences were found for CL and SPH, with z-values of up to 4. The other phospholipids presented z-values of up to 2.5 (in absolute value).

According to the results obtained for the different phospholipid classes, the different packaging systems of non-irradiated and irradiated pork loin were treated separately in fresh and marinated loin.

4. DISCUSSION

As far as we are aware, studies about changes in each phospholipid class with different irradiation and packaging during storage have not been previously reported.

Table 2
Mean and standard deviation values for the phospholipid classes determined in the loin fat samples

	Fresh (n = 27)		Marinated (n = 27)	
	Mean (ng g^{-1})	Mean (%)	Mean (ng g^{-1})	Mean (%)
CL	1.41 ± 0.99	2.93 ± 2.17	3.11 ± 1.32	8.28 ± 2.16
PE	12.41 ± 5.33	23.93 ± 7.24	8.14 ± 5.64	20.27 ± 5.67
PI	3.03 ± 1.46	5.91 ± 2.42	2.10 ± 0.91	5.52 ± 0.65
PC	33.30 ± 20.60	57.20 ± 11.38	21.75 ± 7.92	57.64 ± 4.02
SPH	3.68 ± 1.57	7.19 ± 2.37	2.11 ± 0.93	5.57 ± 0.77
LPC	1.40 ± 0.61	2.84 ± 1.29	1.00 ± 0.54	2.72 ± 1.25

Table 3
Means and ranges of phospholipid classes (ng g^{-1}) and Mann-Whitney U Test By variable. Type Marked tests are significant at $p < 0.05$

	All samples (n = 54)	Fresh (n = 27)	Marinated (n = 27)	U	Z
CL ^d	1.87(0.00-7.07)	1.42(0.00-4.61)	3.13(1.21-7.07)	82.0000	-4.88724
PE ^c	9.44(1.82-31.50)	12.95(1.82-27.24)	5.52(3.30-31.50)	150.0000	3.71084
PI ^b	2.30(0.52-6.72)	2.69(0.52-6.72)	1.88(1.14-4.79)	196.0000	2.91505
PC ^a	23.73(3.80-99.24)	33.63(3.80-99.24)	20.18(10.49-41.59)	217.0000	2.55175
SPH ^d	2.45(0.94-7.50)	3.57(0.94-7.50)	1.90(1.13-5.22)	117.0000	4.28174
LPC ^b	1.03(0.36-2.58)	1.26(0.36-2.58)	0.83(0.42-2.32)	213.0000	2.62095

^a for $p < 0.05$; ^b for $p < 0.01$; ^c for $p < 0.001$ and ^d for $p < 0.0001$.

The end of the shelflife of samples was established when the microbial load reached the value of 107 cfu g^{-1} (Cabeza *et al.*, 2007). Accordingly, the shelflife of both fresh and marinated loin stored under the selected conditions will be different according to the strength of the method of microbiota inhibition. However, the statistical analysis showed that these differences did not affect the integrity of most of the phospholipid classes. The normality of the variables in the comparison groups was studied by means of the Kolmogorov - Smirnov - Lilliefors test. In light of the results of this test, non-parametric tests, such as the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test, were used for all between-group comparisons.

In order to determine the significant differences between different phospholipid classes for two time values used and both types of samples, a Mann-Whitney U test was performed. The statistical parameter U was obtained for each compound and the respective z-values were calculated for comparison with the z-value in the normalized standard distribution for 95% confidence. Table 4 shows the results of this application. It can be observed that significant differences ($p < 0.01$) have been found for PI in fresh loin, showing a lower level for shelflife. PE also presented a reduction, but the difference between these two states was not significant. These decreases can be due to the oxidation of fatty acids from these

phospholipid classes. Although the fatty acid compositions of each phospholipid class from the subcutaneous or intramuscular fat of white pork have not been studied, this has been done in Iberian ham, where PE and PI showed the highest contents in C22:6 (n-6) and C22:6 (n-3) acids (Nárvaez-Rivas *et al.*, 2011). This composition could favor the oxidation of the fatty acids and the concomitant loss of these phospholipid classes. This effect may be attributed to the availability of oxygen during the E-beam treatment. Ozone (Olson 1998) and oxygen peroxide (Whitburn *et al.*, 1982) are produced by radiolysis of water. Both compounds are strong oxidizing agents which, in turn, could work together with the oxygen in the atmosphere (not in the vacuum packaged) for oxidizing the phospholipid fatty acids, as it is well known that they are endowed with a high degree of instauration. However, no differences have been found for marinated loin, which could be explained by the presence of ascorbic acid in these samples since this may act as a reducing agent.

In Table 5, the results obtained from the Mann-Whitney U test to study the effect of temperature are presented for both kinds of samples (fresh and marinated). Two temperatures (4 and 8 °C) have been applied for storage. Only significant differences ($p < 0.05$) are observed for CL in the fresh loin. There are no references about the effect of temperature in phospholipid classes. So it

Table 4
Mann-Whitney U Test according to time for both types of sample.
Marked tests are significant at $p < 0.05$

	Fresh (n = 27)			Marinated (n = 27)		
	U	Z	p-level	U	Z	p-level
CL	49.00000	-1.64590	0.099785	76.00000	0.25717	0.797046
PE	50.00000	1.59447	0.110832	80.00000	-0.05143	0.958979
PI	29.00000	2.67459	0.007482	62.00000	0.97725	0.328444
PC	76.00000	0.25717	0.797046	78.00000	0.15430	0.877371
SPH	67.00000	0.72008	0.471475	78.00000	-0.15430	0.877371
LPC	78.00000	-0.15430	0.877371	60.00000	-1.08012	0.280088

Table 5
Mann-Whitney U Test according to temperature for both types of sample.
Marked tests are significant at $p < 0.05$

	Fresh (n = 27)			Marinated (n = 27)		
	U	Z	p-level	U	Z	p-level
CL	33.00000	-2.46885	0.013555	56.00000	1.285861	0.198492
PE	53.00000	1.44016	0.149822	74.00000	0.360041	0.718817
PI	53.00000	1.44016	0.149822	44.00000	1.903075	0.057032
PC	80.00000	0.05143	0.958979	54.00000	1.388730	0.164916
SPH	76.00000	-0.25717	0.797046	51.00000	1.543033	0.122824
LPC	44.00000	-1.90307	0.057032	64.00000	0.874386	0.381909

seems that CP fatty acids are more prone to being oxidized, yielding a higher phospholipid molecule fragmentation. In the marinated loin, again no differences have been found, possibly because of the additives used.

In addition, the effect of packaging atmosphere (air, MAP and vacuum) has been studied by applying a Kruskal-Wallis test. The results are shown in Table 6 and it can be deduced that there are significant differences ($p < 0.05$) between MAP and vacuum for PE in the case of marinated loin, with the highest mean value in MAP. This fact has no explanation and no references about it have been found. On the contrary, the packaging atmosphere has no effect on phospholipid classes from fresh loin.

Finally, several irradiation doses have been used for both types of loin (0, 1 and 2 kGy). The effect of this was also studied using a Kruskal-Wallis test, whose data are presented in Table 7. No effect of the irradiation doses (until 2 kGy) on changes in the individual phospholipids was observed, which is a valuable result since E-beam may be applied as a useful tool to extend the shelf-life of fresh loin without alterations in, perhaps, the most sensitive molecules of the meat lipid fraction.

5. CONCLUSIONS

In this work, a study of the effects of E-beam irradiation and packaging on the phospholipid classes from fresh and marinated pork loin has been carried out for the first time. The HPLC/ELSD method is a rapid, sensitive and highly reproducible procedure for the separation and quantification of the different phospholipid classes in a given sample.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Prof. J.A. Ordóñez for her help and advice. This study was supported by projects P08-AGR-03498, AGL-2007-65235-C02-02 and CSD 2007-00016 of the program CONSOLIDER INGENIO 2010.

REFERENCES

Ahn DU, Jo C, Du M, Olson DG, Nam KC. 2000. Quality characteristics of pork patties irradiated and stored in different packaging and storage conditions. *Meat Sci.* **56**, 203-209.

Table 6
Significant differences within both types of sample (fresh and marinated)
for the phospholipid classes analyzed according to the different packaging atmospheres
(air, MAP and vacuum)

	Fresh (n = 27)				Marinated (n = 27)			
	H	A/V	A/MAP	V/MAP	H	A/V	A/MAP	V/MAP
CL	0.61	ns	ns	ns	1.06	ns	ns	ns
PE	5.77	ns	ns	ns	6.11	ns	ns	*
PI	6.18	ns	ns	ns	4.09	ns	ns	ns
PC	1.63	ns	ns	ns	5.14	ns	ns	ns
SPH	4.28	ns	ns	ns	4.02	ns	ns	ns
LPC	6.10	ns	ns	ns	0.32	ns	ns	ns

ns, not significant; * $p < 0.05$; air: A; vacuum: V. Comparison between packaging atmospheres using Kruskal-Wallis Test.

Table 7
Significant differences within both types of samples (fresh and marinated)
for the phospholipid classes analyzed according to the different irradiation
doses (0, 1 and 2 kGy)

	Fresh (n = 27)				Marinated (n = 27)			
	H	0/1	0/2	1/2	H	0/1	0/2	1/2
CL	0.06	ns	ns	ns	2.61	ns	ns	ns
PE	1.60	ns	ns	ns	2.92	ns	ns	ns
PI	1.47	ns	ns	ns	3.52	ns	ns	ns
PC	1.07	ns	ns	ns	2.29	ns	ns	ns
SPH	0.84	ns	ns	ns	3.35	ns	ns	ns
LPC	0.87	ns	ns	ns	0.47	ns	ns	ns

ns, not significant; Comparison between irradiation doses using Kruskal-Wallis Test.

- Ali MS, Kang GH, Yang HS. 2007. A Comparison of meat characteristics between duck and chicken breast. *Asian Australas J. Anim. Sci.* **20**, 1002-1006.
- Boselli E, Pacetti D, Curzi F, Frega NG. 2008. Determination of phospholipid molecular species in pork meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and evaporative light scattering detection. *Meat Sci.* **78**, 305-313.
- Cabeza MC, Cambero MI, Hoz L, Ordóñez JA. 2007. Optimization of E-beam treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **8**, 299-305.
- Cabeza MC, de la Hoz L, Velasco R, Cambero MI, Ordóñez JA. 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. *Meat Sci.* **83**, 320-327.
- Cambero MI, de la Hoz L, Sanz B, Ordóñez JA. 1991. Lipid and Fatty Acid Composition of Rabbit Meat: Part 2. DPhospholipids. *Meat Sci.* **29**, 167-176.
- Candek-Potokar M, Zlender B, Lefouchier L, Bonneau M. 1998. Effects of age and/or slaughter weight at slaughter on LM: Biochemical and sensory quality in pigs. *Meat Sci.* **48**, 287-300.
- Chen X, Jo C, Lee JI, Ahn DU. 1999. Lipid Oxidation, Volatiles and Color Changes of Irradiated Pork Patties as Affected by Antioxidants. *J. Food Sci.* **64**, 16-19.
- Chiu EM, Kuo MC, Bruechert LJ, Ho CT. 1990. Substitution of pyrazines by aldehydes in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 58-61.
- Choi YH. 2009. Conjugated linoleic acid as a key regulator of performance, lipid metabolism, development, stress and immune functions, and gene expression in chickens. *Asian Australas J. Anim. Sci.* **22**, 448-458.
- Church IJ, Parsons AL. 1995. Modified atmosphere packaging technology: a review. *J. Sci. Food Agric.* **67**, 143-152.
- Dainty RH, Mackey BM. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol. (Symposium Suppl)* **73**, 103-114.
- Du M, Ahn DU, Mendonca AF, Wesley IV. 2002. Quality characteristics of irradiated ready-to-eat breast rolls from turkeys fed conjugated linoleic acid. *Poultry Sci.* **81**, 1378-1384.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Gandemer G. 2002. Lipids in muscles and adipose tissues: Changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Sci.* **62**, 309-321.
- García RJA, Gibert J, Díaz, I. 1994. Determination of neutral lipids from subcutaneous fat of cured ham by capillary gas chromatography and liquid chromatography. *J. Chrom.* **667**, 225-233.
- Groninger HS, Tappel AL, Knapp, FW. 1956. Some chemical and organoleptic changes in gamma irradiated meats. *Food Res.* **21**, 555-564.
- Hoz L, Cambero MI, Cabeza MC, Herrero AM, Ordóñez JA. 2008. Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by e-beam radiation. *J. Food Protect* **71**, 2001-2006.
- Huang YC, Li HJ, He ZF, Wang T, Qin G. 2010. Study on the Flavor Contribution of Phospholipids and Triglycerides to Pork. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 1267-1276.
- Huff-Lonergan E, Baas TJ, Malek M, Dekkers JC, Prusa K, Rothschild MF. 2002. Correlations among selected pork quality traits. *J. Anim. Sci.* **80**, 617-627.
- Kuchmak M, Dugan LR. 1963. Phospholipids of pork muscle tissues. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **40**, 734-736.
- Lambert AD, Smith JP, Dodds K. 1992. Physical, chemical and sensory changes in irradiated fresh pork packaged in modified atmosphere. *J. Food Sci.* **57**, 1294-1299.
- Lefebvre N, Thibault C, Charbonneau R, Piette, JP. 1994. Improvement of shelf-life and wholesomeness of ground beef by irradiation. 2. Chemical analysis and sensory evaluation. *Meat Sci.* **36**, 371-380.
- Livingston M, Brewer MS, Killifer J, Bidner B, McKeith F. 2004. Shelf life characteristics of enhanced modified atmosphere packaged pork. *Meat Sci.* **68**, 115-122.
- Lonergan SM, Huff-Lonergan E, Rowe LJ, Kuhlert DL, Jungst SB. 2001. Selection for lean growth efficiency in Duroc pigs: Influence on pork quality. *J. Anim. Sci.* **79**, 2075-2085.
- Meynier A, Genot C, Gandemer G. 1998. Volatile Compounds of Oxidized Pork Phospholipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 1-7.
- Ministerio de Comercio Exterior, (Documento preliminar), Actualizado el 5/10/072007, Acuerdo de asociación entre centro América y la UE.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino), 2000. Estudio sobre la comercialización agroalimentaria en el sector cooperativo español. CAPITULO V: Promoción y exportación de la carne de porcino en el entorno cooperativo.
- Mitchell GE. 1994. Irradiation preservation of meats. *Food Aust.* **46**, 512-517.
- Mottram DS, Whitfield FB. 1995. Volatiles compounds from the reaction of cysteine, ribose, and phospholipids in low moisture systems. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 984-988.
- Narváez-Rivas M, Gallardo M, Rios JJ, León-Camacho M. 2011. A new high-performance liquid chromatographic method with evaporative light scattering detector for the analysis of phospholipids. Application to Iberian pig subcutaneous fat. *J. Chrom. A* **1218**, 3453-3458.
- Olson DG. 1998. Irradiation of food: Scientific status summary. *Food Technol.* **52**, 56-62.
- Olsson C, Ahrné S, Pettersson B, Molina G. 2003. The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S RNA genes. *Int. J. Food Microbiol.* **83**, 245-252.
- Patterson RL, Stevenson MH. 1995. Irradiation-induced off-odor in chicken and its possible control. *Brit. Poultry Sci.* **36**, 425-441.
- Sasaki K, Ishihara K, Oyamada C. 2008. Effects of fucoxanthin addition to ground chicken breast meat on lipid and colour stability during chilled storage, before and after cooking. *Asian Australas J. Anim. Sci.* **21**, 1067-1072.
- Thayer DW, Fox JB, Lakritz L. 1993. Chapter 23: Effects of ionizing radiation treatments on the microbiological, nutritional, and structural quality of meats, in Spanier AM, Okai H and Tamura M (Ed.) *Food Flavor and Safety*. Am. Chem. Soc. 294-302.
- Weihrauch JL, Son YS. 1983. The phospholipids content of foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60**, 1971-1978.
- Whitburn KD, Shieh JJ, Sellers RM, Hoffmann MZ, Taub, IA. 1982. Redox transformations in ferrimyoglobin induced by radiation-generated free radicals in aqueous solution. *J. Biol. Chem.* **257**, 1860-1869.

Recibido: 20/8/12
Aceptado: 4/10/12

ARTÍCULO 4

Changes in the volatile compounds of pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage

Aceites y grasas. 2013. 64: 250-263

Changes in the volatile compounds of pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage

By I. García-Márquez², M. Narváez-Rivas¹, E. Gallardo¹, C.M. Cabeza²
and M. León-Camacho^{1,*}

¹ Food Characterization and Quality Department. Instituto de la Grasa (C.S.I.C.). Spain

² Department of Nutrition, Bromatology and Food Technology. Faculty of Veterinary, University Complutense, Avda. Puerta de Hierro, S/N, E-28040 Madrid, Spain

* Corresponding author: e-mail: mleon@cica.es

RESUMEN

Cambios en los compuestos volátiles del lomo de cerdo (fresco y adobado) con diferentes irradiaciones y empaquetados durante el almacenamiento

Se ha utilizado la cromatografía de gases/espectrometría de masas, la extracción mediante purga y trampa para estudiar los compuestos volátiles de lomo de cerdo fresco y adobado, tratados con electrones acelerados (1 y 2 kGy) y almacenado en refrigeración (4 y 8 °C) bajo diferentes atmósferas (aire, vacío y atmósfera modificada). Se observaron diferencias importantes entre las muestras de lomo fresco y adobado pero, en general, solo pequeñas diferencias fueron observadas en algunos compuestos volátiles de ambos tipos de lomo debidas al efecto de la temperatura, tiempo de almacenamiento, tipo de atmósfera o dosis de radiación. Se ha concluido que la aplicación de electrones acelerados es una tecnología muy eficaz para ampliar la vida útil del lomo de cerdo fresco y adobado sin que se detecten cambios en el olor de los productos.

PALABRAS CLAVE: Adobado – Compuestos volátiles – Empaquetado – Fresco – GC-Purga y Trampa – Lomo de cerdo – Radiación de haz de electrones.

SUMMARY

Changes in the volatile compounds of pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage

The analysis of volatile compounds by gas chromatography-mass spectrometry after extraction by purge and trap has been used to investigate the volatile compounds of fresh and marinated pork loin after E-beam treatment as a function of packaging type (air, vacuum and modified atmosphere), radiation dose (1 and 2 kGy) and storage temperature (4 and 8 °C). Major differences were found between fresh and marinated samples but, in general, only minor differences were found in the volatile compounds of both types of loin due to storage temperature, packaging method and doses of irradiation. It is concluded that the application of E-beam is a very useful way to extend the shelf-life of fresh and marinated pork loin with no changes in the odor of the products.

KEY-WORDS: E-beam irradiation – Fresh – GC-Purge and Trap – Marinated – Packaging – Pork loin – Volatile Compound.

1. INTRODUCTION

Worldwide, the population of pigs for human consumption rises to 956 million. The pork production contributes over 39% of the global production of meat for human consumption, an equivalent of 15.3 kg of pork consumed per person per year (MAPA, 2006). In Spain, the annual quantity per capita goes up to 58 kg of pork. To meet this demand, 37.5 million hogs are sent to slaughter annually. They are often killed when they turn 6 months old and weigh 100 kg. In the EU, this figure rises to 240 million pigs annually sent to slaughterhouses (MAPA, 2006).

The food industry has made great efforts to improve the maintenance of sanitary conditions and prevent the contamination of food, although a number of pathological processes associated with food still remain. The level of contamination can be reduced by good hygiene practices, but some pathogens are impossible to eliminate, especially in raw foods with minimal processing. Irradiation is presented as a possible method of decontamination for this food group. The most common alterations in the microorganisms in meat are Gram negative psychrotrophs which, in turn, are very susceptible to radiation because they are practically eliminated by a dose of 1 kGy (Monk *et al.*, 1995). Irradiation is also a very effective way to eliminate the pathogens present in foods, including *L. monocytogenes* (Patterson and Damoglou, 1993, Sommers *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 2005) and *Salmonella* spp (Grant and Patterson, 1991, 1992, ICMSF, 1996, Patterson 1988, Tarkowski *et al.*, 1984, Thayer *et al.*, 1990, Cabeza *et al.*, 2009, Cabeza *et al.*, 2007).

The quality of the meat may be affected, depending on dose, temperature, and atmosphere during treatment as well as storage conditions. As seen in various studies, the irradiation of meat can produce changes in its aroma, color and flavor, which can significantly affect consumer acceptance (Thayer, 1993, Ahn *et al.*, 1998, Ahn, *et al.*, 2000; Chouliara *et al.*, 2006, Jo and Ahn, 2000, Samelis *et al.*, 2005). In addition, these factors influence

oxidative chemical changes (Katusin-Razem *et al.*, 1992).

An array of flavor- and odor-active volatiles occurs in meat (acids, alcohols, aldehydes, aromatic compounds, esters, ethers, furans, hydrocarbons, ketones, lactones, pyrazines, pyridines, pyrroles, sulfides, thiazoles, thiophenes, pyrroles, and oxazoles (Shahidi, 1994, Lorenz *et al.*, 1983). Several authors indicate that irradiated meat, regardless of packaging methods, produced more volatile compounds than non-irradiated meat and developed a distinctive smell after irradiation (Ahn *et al.*, 1998). This characteristic odor has been described as metallic, sulfide, wet dog, wet grain, worse, rotten egg, sweet, bloody, cooked meat, barbecued corn, burnt, sulfur, metallic, alcohol, acetic acid, liver-like serummy, and bloody (Huber *et al.*, 1953, Groninger *et al.*, 1956, Hampson *et al.*, 1996; Jo *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 1996a, Lee *et al.*, 1996b, Luchsinger *et al.*, 1997c, Merritt *et al.*, 1975). Some of the precursors of the off-odor compounds which are water-soluble contain nitrogen and/or sulfur (Schweigert *et al.*, 1954).

One of the main defects of irradiated meat is this characteristic odor, which is produced by the oxidation of lipids in the presence of oxygen. In raw meat, odors can be developed or disappear during cooking (Luchsinger *et al.*, 1996, Hashim *et al.*, 1995 and Ahn *et al.*, 1998). Most of the chemical changes in irradiated meat are associated with free radical reactions (Ahn and Lee, 2004). The characteristic odor of the irradiation process is supposed to be the result of oxidation of the free acids. Changes in the chemical oxidation by E-beam radiation depend on the dose and the presence of oxygen has a significant effect on the development of odor and its intensity (Merritt *et al.*, 1975). Free radicals formed by this process interact with most organic molecules such as proteins, lipids, etc (Kim *et al.*, 2008, Ahn 2001, Patterson and Stevenson, 1995) and they are clearly different from the characteristics of the oxidation of lipids.

Fatty acids are important precursors of the flavor of pork, because they are the main source of carbonyl compounds by heating (Selke *et al.*, 1977, 1980). Therefore, carbonyl compounds are important for the odor of irradiation and its intensity depends on the essence of oxygen during irradiation (Reineccius, 1979).

The most important substance in the changes in meat quality are lipids, the effect of the fat content of irradiated meat is limited in the development of lipid oxidation, color changes or the production of volatiles production (Jo *et al.*, 1999). A considerable amount of researches had been devoted to the study of the volatile compounds of meat. Among these studies, Ahn *et al.* (2001) researched the effect of irradiation on the volatile compounds of pork during storage, with different packaging. The volatiles were analyzed using the dynamic headspace GC / mass spectrometry method. Studying the gas chromatograms of irradiated raw pork suggested that the odor is caused by radiolytic protein degradation and lipid oxidation.

Irradiation had a significant impact on pork in the number and profile of volatile compounds. Butane, propane, mercaptomethane, dimethyl sulfide, methyl thioacetate and dimethyl disulfide were produced by irradiation, and were not detected in non-irradiated pork. Kim *et al.*, (2008) also showed that irradiated pork samples formed a greater number of volatile compounds and increased their contents. They were identified by SPME GC / MS. On the other hand Huang *et al.*, (2010) studied the contribution of the flavor of triglycerides and phospholipids of pork and observed a difference in taste between two breeds of pigs. The volatile compounds were extracted using solid phase microextraction (SPME) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Once identified, they were grouped into classes of lipid-derived aldehydes, Maillard derived aldehydes, alkanes, ketones, alcohols, sulfur compounds containing nitrogen-containing compounds, and furans.

The aim of this study was to investigate the effect of electron-beam irradiation on the volatile compounds in raw and marinated pork loin with different packaging and storage times.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and standards

2-butanone, Pentanal, Hexanal, 2-heptanone, Heptanal, 2-hexenal, 2-octanone, Octanal, 2-heptenal, 6-methyl-5-hepten-2-one, 2-nonanone, Nonanal, 2-octenal, Decanal, Nonenal, 2-decenal and Isoamyl butyrate were obtained from Sigma Aldrich Fluka (Steinheim, Germany). Standard solutions were prepared using fully deodorized edible oil as matrix. Concentrations were in the range of 0.1-5.0 $\mu\text{g g}^{-1}$.

2.2. Samples and Sample treatment

A total of fifty-four slices of fresh (Garcia-Marquez *et al.*, 2012a) and marinated (Garcia-Marquez *et al.*, 2012b) pork loin were packaged into low gas permeability laminated plastic bags (diffusion coefficient of 35 $\text{cm}^3/24 \text{ h m}^2 \text{ bar}$ for O_2 and 150 $\text{cm}^3/24 \text{ h m}^2 \text{ bar}$ for CO_2) with a 5:1 (v/w) gas/product ratio. Three batches were made. An aerobically packaged batch was used as control and the remainder were packaged in either a vacuum or a carbon dioxide enriched atmosphere ($\text{CO}_2/\text{O}_2/\text{N}_2$) (30/20/50) (v/v/v) by means of a thermo forming packaging machine, model TMM 37/28 (Vapta, Madrid, Spain).

Samples were treated in an industrial electron beam radiation source working at the energy of 10 MeV. The radiation doses employed were 1 and 2 kGy. The dose absorbed by the samples was verified considering the absorbance of cellulose triacetate dosimeters (ASTM, 2000) simultaneously irradiated. Following the irradiation treatment, they were stored in thermostated chambers at 4 and 8 °C,

the latter as an example of temperature abuse during product storage and distribution. Table 1 shows the E-beam treatment applied and the identification code assigned to each one.

2.3. Volatile compound analysis

Extraction of volatile compounds. The volatile compounds were isolated from 1.5 g of minced sample by the dynamic headspace technique and adsorbed on a Tenax trap, using a Purge and Trap (P&T) Concentrator apparatus Tekmar velocity XPT (Thousand Oaks, CA, USA), based on the method described by Narváez-Rivas *et al.*, (2010). The purge conditions were as follows: sample temperature, 45 °C; Tenax trap temperature, 35 °C; purge gas flow, 350 mL min⁻¹ of nitrogen; purge time, 14 min. After the purge time, the volatile compounds were desorbed by heating in the Tenax trap at 225 °C for 1 min, and sent through the transfer line (kept at 150 °C) into the chromatograph injector.

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis. The GC-ion-trap-MS analyses were performed using a Varian 3800 gas chromatograph coupled to a Saturno 2000 ion trap mass spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA). The system was equipped with a 1079 injector operating in full scan mode from 50 to 600 amu at 1 scan sec⁻¹ for the purpose of identification. The column used was a Supelcowax-10 (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA) fused silica capillary column (60 m long × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness). The GC conditions included hydrogen as carrier gas at 1.6 mL min⁻¹ in constant flow mode. The oven temperature was held at 40 °C for 14 min and then raised to 91 °C at 1 °C min⁻¹, and then to 201 °C at 10 °C min⁻¹, and then to 220 °C at 5 °C min⁻¹, where it was held for 20 min. Split injection mode was used with a ratio of 1:5. The injector temperature was kept at 250 °C. The MS operating conditions were the following: ion source and transfer line temperatures were 200 and 290 °C, respectively; the electron energy was 70 eV with a resolution of 1 and the emission current 250 µA; dwell time and inter-channel delay were 0.08 s and 0.02 s, respectively. For GC-ion trap-MS, Varian MS Workstation version 6.3 software was used for data acquisition and processing of the results. The aldehydes and ketones present in the volatile fraction of the fat samples were identified by computer matching of their mass spectra with those from NIST (National Institute of Standards and Technology) and Wiley libraries and verified by standards purchase from Sigma-Aldrich and Fluka (S. Louis, MO). Peak area was used as analytical signal.

2.4. Quantitative analysis and statistical treatment

Thirty-seven volatile compounds were identified. The peak areas of the volatile compounds were

used as analytical signal. The quantification of individual volatile compounds was carried out using isoamyl butyrate as internal standard, which was prepared in refined sunflower oil (14.3407 mg 100 g⁻¹ of oil). An equal relative response factor for any species was assumed. Isoamyl butyrate was used as a reference to calculate the relative retention time, due to the fact that it appears in all samples with high intensity at a mean retention time of 29.52 min. A representative chromatogram report of the volatile compounds of pork loin and their corresponding peaks are shown in Figures 1A and 1B. The relative retention time, molecular ion and base peak of the corresponding peaks are included in Table 2.

The volatile compounds identified were considered as chemical descriptors. A data matrix, whose rows are the samples and whose columns are the variables, was built. Each element of this matrix x_{ij} corresponds to the content of volatile compounds j for the sample i . Statistical analyses based on non-parametric techniques were used, including the Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors test, which was used to evaluate the normality of each variable included in the study. Since the data distribution was not normal, non-parametric tests were applied. The Kruskal-Wallis test was used to find out significant differences among the variables with three levels. This test is considered as an ANOVA test for one factor. The Mann-Whitney U test was used to determinate the differences between two levels of a same variable. This test is considered similar to a t-Student test for independent samples groups. The calculations were made using the statistical package CSS: STATISTICA from StatsoftTM (Tulsa, OK, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Volatile identification

3.1.1. Purge and trap GC-MS analysis

A total of thirty seven volatile compounds were tentatively identified in the volatile fraction from pork loin (fresh and marinated) for the first time using P&T-GC-MS. A tentative assignment of the chromatographic peaks was done by comparing the spectra with those from NIST (National Institute of Standards and Technology) and WILEY libraries and verified by standards purchased from Sigma-Aldrich and Fluka (S. Louis, MO).

The volatile components of the samples were separated using a high polarity column and the conditions of the purge and trap system and GC-MS were previously described (Narváez-Rivas *et al.*, 2010). Under the conditions used in the purge step no degradation of the matrix sample was observed. Repeatability was checked by consecutive analysis of one sample for 12 times and the values expressed as relative standard deviation ranged between 15.3 and 28.7%.

Table 1
Analysed intramuscular fat from pork loin samples

Code	Type	Temperature (°C)	Atmosphere	Radiation (kGy)	Time (days)
1F	Fresh	4	Air	0	0
2F	Fresh	4	Air	1	0
3F	Fresh	4	Air	2	0
4F	Fresh	4	Vacuum	0	0
5F	Fresh	4	Vacuum	1	0
6F	Fresh	4	Vacuum	2	0
7F	Fresh	4	MAP	0	0
8F	Fresh	4	MAP	1	0
9F	Fresh	4	MAP	2	0
10F	Fresh	4	Air	0	10
11F	Fresh	4	Air	1	10
12F	Fresh	4	Air	2	10
13F	Fresh	4	Vacuum	0	10
14F	Fresh	4	Vacuum	1	10
15F	Fresh	4	Vacuum	2	10
16F	Fresh	4	MAP	0	10
17F	Fresh	4	MAP	1	10
18F	Fresh	4	MAP	2	10
19F	Fresh	8	Air	0	10
20F	Fresh	8	Air	1	10
21F	Fresh	8	Air	2	10
22F	Fresh	8	Vacuum	0	10
23F	Fresh	8	Vacuum	1	10
24F	Fresh	8	Vacuum	2	10
25F	Fresh	8	MAP	0	10
26F	Fresh	8	MAP	1	10
27F	Fresh	8	MAP	2	10
1M	Marinated	4	Air	0	0
2M	Marinated	4	Air	1	0
3M	Marinated	4	Air	2	0
4M	Marinated	4	Vacuum	0	0
5M	Marinated	4	Vacuum	1	0
6M	Marinated	4	Vacuum	2	0
7M	Marinated	4	MAP	0	0
8M	Marinated	4	MAP	1	0
9M	Marinated	4	MAP	2	0
10M	Marinated	4	Air	0	10
11M	Marinated	4	Air	1	10
12M	Marinated	4	Air	2	10
13M	Marinated	4	Vacuum	0	10
14M	Marinated	4	Vacuum	1	10
15M	Marinated	4	Vacuum	2	10
16M	Marinated	4	MAP	0	10
17M	Marinated	4	MAP	1	10
18M	Marinated	4	MAP	2	10
19M	Marinated	8	Air	0	10
20M	Marinated	8	Air	1	10
21M	Marinated	8	Air	2	10
22M	Marinated	8	Vacuum	0	10
23M	Marinated	8	Vacuum	1	10
24M	Marinated	8	Vacuum	2	10
25M	Marinated	8	MAP	0	10
26M	Marinated	8	MAP	1	10
27M	Marinated	8	MAP	2	10

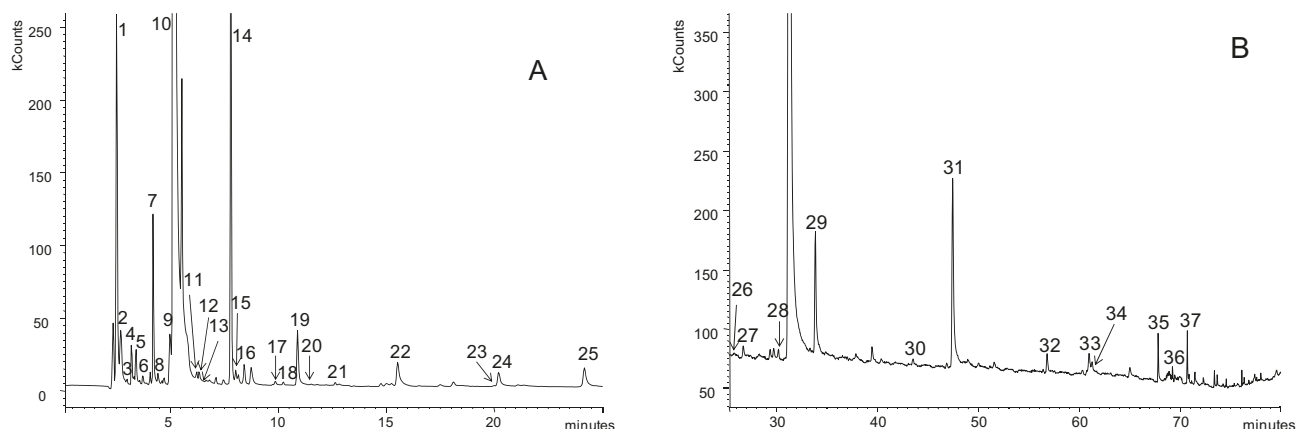


Figure 1
GC-ion-trap-MS chromatograms in full scan mode of total volatile compounds profile from pork loin: A, from 0.0 to 25.0 minutes; B, from 25.0 to 80.0 minutes. Peaks identification: see table 2.

Recoveries for the analytes with available standard varied between 95 and 119%. Figure 1 (A and B) shows a chromatogram of the volatile fraction of pork loin (fresh and marinated). The relative retention time, molecular ion and base peak of the corresponding peaks are included in Table 2. Several volatile compounds are present in this volatile fraction. A total of ten hydrocarbons were detected such as 2,4-dimethyl-hexane, 3-methyl-hexane, 2,5-dimethyl-hexane, 2,4-dimethyl-heptane, 2-octene, 3,5,5-trimethyl-1-hexene, 2-beta-pinene, 3-carene, dl-limonene, and 2-pentyl-furane. Eight aldehydes such as: pentanal, hexanal, heptanal, 2-hexenal, octanal, nonanal, decanal, and 2-decanal. Eight alcohols: 2-(1-methylethoxy)-1-propanol, 2-butanol, 3-methyl-1-butanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 2-ethyl-1-hexanol, 1-octanol, and 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol. Five esters: 2-hydroxypropanoic acid ethyl ester, ethyl ester acetic acid, acetic acid ethenyl ester, ethyl ester butanoic acid and ethyl ester hexanoic acid. Four ketones: 2-propanone, 2-butanone, 2-pentanone, and 1-(methylphenyl)-ethanone have been detected. Along with other volatile compounds like chloroform, dimethyl disulphide and 2-nitrobutane.

Some of these compounds have been previously described in pork meat by several authors (Ahn *et al.*, 1998, Ahn, *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2001; Jo and Ahn, 2000; Kim *et al.*, 2008). They are: dimethyl disulphide, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, hexanol, heptanol, 2-pentanone, 2-butanone, and 2-octene. Nonetheless, there are 25 other volatile compounds detected in the loin of pork that have been identified for the first time in this study such as: 2,4-dimethyl-hexane, 3-methyl-hexane, 2,5-dimethyl-hexane, 2,4-dimethyl-heptane, 3,5,5-trimethyl-1-hexene, 2-beta-pinene, 3-carene, dl-limonene, and 2-pentyl-furane, 2-hexenal, 2-decanal, 2-(1-methylethoxy)-1-propanol, 2-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-ethyl-1-hexanol, 1-octanol, and 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol, 2-hydroxypropanoic acid ethyl ester, ethyl ester acetic acid, acetic acid ethenyl ester, ethyl ester butanoic acid, ethyl ester hexanoic acid, 2-propanone,

1-(methylphenyl)-ethanone, chloroform, and 2-nitrobutane.

3.2. Volatile compounds in fresh and marinated loin

Table 3 shows the median minimum and maximum values of the volatile compounds analyzed in the loin (as mg kg⁻¹ of fat) corresponding to the fresh and marinated. In this table, it can be deduced several interesting observations. Firstly, it would be interesting to stand out that there are five compounds which have been detected only in marinated samples, they are: 2-beta-pinene, 2-nitrobutane, 3-carene, dl-limonene, and 2-ethyl-1-hexanol. The rest of volatile compounds are presented in both, fresh and marinated loin samples.

Moreover, it can be observed that there are other compounds that although they are in both types of samples, they have higher quantities in marinated loin samples than in fresh loin, they are: 3-methyl-hexane, 2-hydroxypropanoic acid ethyl ester, 1-heptanol, 2-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-pentyl-furane, ethyl ester hexanoic acid, decanal, 1-octanol and 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol.

In addition, most of volatile compounds are in higher amount in fresh loin than in marinated loin, but only there is a significant increase ($p < 0.05$) in some of them: 2-propanone, 2-octene, 3,5,5-trimethyl-1-hexene, dimethyl disulphide, 1-(methylphenyl)-ethanone, and 1-hexanol.

3.3. Effect of different conditions of treatment and storage

In order to find out significant differences between the two types of loin, the Mann-Whitney U test was performed. The statistical parameter U was obtained for each compound and the respective z-values were calculated for being compared with the z-value in the normalized standard distribution for 95% confidence ($z = 1.96$). Results

Table 2
Volatile compounds identified in pork loin (see Figure 1)

Peak	Compound	I	T _{RR}	Base peak	M ⁺
1	2,4-dimethyl-hexane	S/L	0.081	43	114
2	3-methyl-hexane	S/L	0.088	43	100
3	2,5-dimethyl-hexane	S/L	0.093	43	114
4	2,4-dimethyl-heptane	L	0.105	43	128
5	2-propanone	S/L	0.112	43	58
6	2-octene	S/L	0.117	55	112
7	Ethyl ester acetic acid	S/L	0.139	43	88
8	2-butanone	S/L	0.146	43	72
9	2-(1-methylethoxy)-1-propanol	S/L	0.165	45	118
10	2-hydroxypropanoic acid ethyl ester	L	0.171	45	118
11	2-pentanone	S/L	0.202	43	86
12	Pentanal	S/L	0.206	44	86
13	Acetic acid ethenyl ester	S/L	0.211	43	86
14	Chloroform	S/L	0.259	83	124
15	2-butanol	S/L	0.268	45	74
16	Ethyl ester butanoic acid	S/L	0.280	71	116
17	3,5,5-trimethyl-1-hexene	S/L	0.327	57	126
18	Dimethyl disulphide	S/L	0.341	94	94
19	Hexanal	S/L	0.363	44	100
20	2-Beta-Pinene	S/L	0.383	93	136
21	2-Nitrobutane	S/L	0.428	29	103
22	3-Carene	S/L	0.501	93	136
23	Heptanal	S/L	0.673	43	114
24	dl-Limonene	S/L	0.683	68	136
25	3-methyl-1-butanol	S/L	0.802	55	88
26	2-pentyl-furane	S/L	0.852	81	140
27	Ethyl ester hexanoic acid	S/L	0.869	88	145
28	1-(methylphenyl)-ethanone	L	0.970	41	136
29	Octanal	S/L	1.086	41	128
30	1-hexanol	S/L	1.397	56	102
31	Nonanal	S/L	1.525	57	142
32	1-Heptanol	S/L	1.828	70	99
33	Decanal	S/L	1.955	43	157
34	2-ethyl-1-hexanol	S/L	1.971	57	130
35	1-octanol	S/L	2.182	41	113
36	4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol	S/L	2.228	71	154
37	2-decenal	S/L	2.275	43	154

I: Identification; L: Library; S: Standard; T_{RR}: relative retention time; M⁺: molecular ion

of application of this test are also shown in table 3. It can be observed that the obtained z-values were higher than the critical one for 2-octene, ethyl ester acetic acid, 2-butanone, 2-butanol, 3,5,5-trimethyl-

1-hexene, dimethyl disulphide, 2-Beta-Pinene, 2-Nitrobutane, 3-Carene, dl-Limonene, 3-methyl-1-butanol, 2-pentyl-furane, Ethyl ester hexanoic acid, 1-(methylphenyl)-ethanone, 1-hexanol, decanal,

Table 3
Median, minimum and maximum values (mg kg⁻¹) for the volatile compounds determined in the analyzed loin samples and Mann-Whitney U Test By variable. Type Marked tests are significant at $p < 0.05000$

Volatile compounds	Fresh (n = 27)			Marinated (n = 27)			U	Z
	Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.		
2,4-dimethyl-hexane	2916.50	31.97	20628.07	2208.48	51.01	15316.98	326.0000	0.66605
3-methyl-hexane	28.97	0.00	232.97	39.32	0.00	365.97	347.0000	-0.30275
2,5-dimethyl-hexane	3.26	0.00	43.59	2.04	0.00	9.75	322.5000	-0.72660
2,4-dimethyl-heptane	60.15	3.23	1337.75	10.02	3.56	17.99	336.0000	-0.49305
2-propanone	102.83	1.47	2107.22	31.18	1.38	405.58	312.0000	0.90825
2-octene ^b	22.96	0.00	505.59	9.22	1.91	49.80	211.0000	-2.65555
Ethyl ester acetic acid ^d	330.73	0.66	8446.78	105.46	11.27	249.71	70.0000	-5.09484
2-butanone ^b	3.52	0.00	41.02	3.82	0.00	14.97	199.0000	-2.86315
2-(1-methylethoxy)-1-propanol	873.71	0.95	13431.47	702.30	0.00	6801.07	359.0000	-0.09515
2-hydroxypropanoic acid ethyl ester	2945.82	0.00	35174.05	3330.15	0.00	25572.48	332.5000	-0.55360
2-pentanone	120.08	0.00	2929.93	7.89	0.00	174.49	356.0000	-0.14705
Pentanal	9.16	0.00	102.86	6.19	0.00	36.27	322.5000	0.72660
Acetic acid ethenyl ester	1.34	0.00	12.96	0.80	0.00	16.04	312.5000	0.89960
Chloroform	2276.19	0.00	56006.88	214.26	0.00	1399.64	297.0000	1.16775
2-butanol ^c	22.79	0.00	229.90	32.69	0.00	459.87	171.0000	-3.34755
Ethyl ester butanoic acid	24.19	0.00	255.86	13.68	0.00	86.86	356.5000	-0.13840
3,5,5-trimethyl-1-hexene ^b	11.13	0.00	255.86	5.26	0.00	65.64	202.0000	-2.81125
Dimethyl disulphide ^b	60.44	0.00	1384.74	3.13	0.00	15.10	177.0000	-3.24375
Hexanal	129.43	1.97	2798.71	22.98	4.83	110.38	274.0000	1.56565
2-Beta-Pinene ^d	0.00	0.00	0.00	5.53	0.00	17.38	81.0000	-4.90454
2-Nitrobutane ^d	0.00	0.00	0.00	11.22	0.92	31.36	0.0000	-6.30584
3-Carene ^d	0.00	0.00	0.00	12.17	0.00	26.30	40.5000	-5.60519
Heptanal	54.25	3.82	1018.52	19.55	1.51	107.44	317.0000	-0.82175
dl-Limonene ^a	0.00	0.00	0.00	3.32	0.00	25.26	229.5000	-2.33550
3-methyl-1-butanol ^b	42.69	3.16	135.75	99.05	0.00	300.43	211.0000	-2.65555
2-pentyl-furane ^a	1.66	0.00	5.84	10.29	0.00	113.51	247.0000	-2.03275
Ethyl ester hexanoic acid ^b	4.34	0.00	88.85	6.56	0.00	24.44	212.0000	-2.63825
1-(methylphenyl)-ethanone ^d	3126.88	0.00	84371.50	5.47	0.83	11.73	138.0000	-3.91844
Octanal	21.51	3.49	109.69	15.14	4.53	83.20	315.0000	0.85635
1-hexanol ^c	67.43	0.00	1770.07	4.48	0.00	13.53	154.5000	-3.63300
Nonanal	24.49	0.00	104.26	21.30	6.06	57.36	334.0000	-0.52765
1-Heptanol	1.27	0.00	11.68	3.25	0.00	51.91	362.0000	0.04325
Decanal ^a	2.64	0.00	61.31	12.04	0.00	62.47	245.5000	-2.05870
2-ethyl-1-hexanol ^d	0.00	0.00	0.00	23.17	0.00	79.53	81.0000	-4.90454
1-octanol ^a	1.08	0.00	8.81	2.49	0.00	19.08	241.0000	-2.13655
4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol ^d	1.47	0.00	32.10	2.60	0.00	7.43	99.0000	-4.59314
2-decenal	4.12	0.00	59.99	0.43	0.00	2.12	283.0000	1.40995

^a for $p < 0.05$; ^b for $p < 0.01$; ^c for $p < 0.001$ and ^d for $p < 0.0001$.

2-ethyl-1-hexanol, 1-octanol and 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol. The highest differences were found for ethyl ester acetic acid,

2-Beta-Pinene, 2-Nitrobutane, 3-Carene, 2-ethyl-1-hexanol and 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol, with z-values up to 4. The other

Table 4
Mann-Whitney U Test by variable time for both types of samples

Volatile compounds	Fresh (n = 27)			Marinated (n = 27)		
	U	Z	p-level	U	Z	p-level
2,4-dimethyl-hexane	41.00000	-2.05738	*	31.00000	2.57172	*
3-methyl-hexane	46.00000	-1.80021	—	35.50000	2.34027	*
2,5-dimethyl-hexane	64.00000	-0.87439	—	51.00000	-1.54303	—
2,4-dimethyl-heptane	76.00000	0.25717	—	56.00000	-1.28586	—
2-propanone	38.00000	2.21168	*	36.00000	-2.31455	*
2-octene	46.00000	-1.80021	—	24.00000	-2.93176	**
Ethyl ester acetic acid	78.00000	0.15430	—	34.00000	-2.41742	*
2-butanone	40.00000	-2.10881	*	3.00000	-4.01189	***
2-(1-methylethoxy)-1-propanol	68.00000	-0.66865	—	19.50000	-3.16322	**
2-hydroxypropanoic acid ethyl ester	36.00000	-2.31455	*	67.00000	0.72008	—
2-pentanone	79.00000	-0.10287	—	27.00000	-2.77746	**
Pentanal	69.00000	0.61721	—	79.00000	0.10287	—
Acetic acid ethenyl ester	70.00000	-0.56578	—	77.00000	-0.20574	—
Chloroform	67.00000	0.72008	—	12.00000	3.54898	***
2-butanol	40.00000	-2.10881	*	39.00000	-2.16025	*
Ethyl ester butanoic acid	65.00000	-0.82295	—	32.00000	2.52029	*
3,5,5-trimethyl-1-hexene	29.50000	-2.64887	**	78.50000	0.12859	—
Dimethyl disulphide	54.00000	-1.38873	—	35.00000	2.36598	*
Hexanal	57.00000	1.23443	—	63.00000	0.92582	—
2-Beta-Pinene	81.00000	0.00000	—	77.50000	-0.18002	—
2-Nitrobutane	81.00000	0.00000	—	79.00000	0.10287	—
3-Carene	81.00000	0.00000	—	64.00000	-0.87439	—
Heptanal	55.00000	1.33730	—	76.00000	0.25717	—
dl-Limonene	81.00000	0.00000	—	64.00000	0.87439	—
3-methyl-1-butanol	79.00000	0.10287	—	73.00000	-0.41148	—
2-pentyl-furane	48.00000	1.69734	—	36.50000	-2.28883	*
Ethyl ester hexanoic acid	76.00000	-0.25717	—	32.00000	2.52029	*
1-(methylphenyl)-ethanone	64.00000	-0.87439	—	65.00000	-0.82295	—
Octanal	42.00000	2.00594	*	59.00000	1.13156	—
1-hexanol	45.00000	-1.85164	—	40.00000	2.10881	*
Nonanal	39.00000	2.16025	*	73.00000	-0.41148	—
1-Heptanol	47.00000	1.74877	—	63.00000	0.92582	—
Decanal	60.00000	1.08012	—	27.00000	-2.77746	**
2-ethyl-1-hexanol	81.00000	0.00000	—	35.00000	2.36598	*
1-octanol	29.00000	2.67459	**	40.50000	-2.08310	*
4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol	54.00000	1.38873	—	72.00000	-0.46291	—
2-decenal	64.00000	0.87439	—	74.50000	-0.33432	—

* For p < 0.05; ** for p < 0.01 and *** for p < 0.001.

Table 5
Mann-Whitney U Test by variable temperature for both types of samples

Volatile compounds	Fresh (n = 27)			Marinated (n = 27)		
	U	Z	p-level	U	Z	p-level
2,4-dimethyl-hexane	59.00000	-1.13156	—	47.00000	1.74877	—
3-methyl-hexane	73.00000	0.41148	—	76.50000	0.23146	—
2,5-dimethyl-hexane	73.00000	0.41148	—	73.00000	0.41148	—
2,4-dimethyl-heptane	63.00000	0.92582	—	78.00000	0.15430	—
2-propanone	36.00000	2.31455	*	33.00000	-2.46885	*
2-octene	62.00000	-0.97725	—	57.00000	-1.23443	—
Ethyl ester acetic acid	80.00000	-0.05143	—	29.00000	-2.67459	**
2-butanone	56.00000	-1.28586	—	31.00000	-2.57172	*
2-(1-methylethoxy)-1-propanol	77.00000	0.20574	—	46.00000	-1.80021	—
2-hydroxypropanoic acid ethyl ester	69.00000	-0.61721	—	59.00000	1.13156	—
2-pentanone	80.00000	0.05143	—	38.00000	-2.21168	*
Pentanal	67.00000	0.72008	—	58.00000	-1.18299	—
Acetic acid ethenyl ester	70.00000	0.56578	—	71.00000	-0.51434	—
Chloroform	47.00000	1.74877	—	55.50000	1.31158	—
2-butanol	43.00000	-1.95451	—	39.00000	-2.16025	*
Ethyl ester butanoic acid	65.00000	0.82295	—	67.00000	0.72008	—
3,5,5-trimethyl-1-hexene	40.50000	-2.08310	*	56.00000	-1.28586	—
Dimethyl disulphide	58.00000	-1.18299	—	80.00000	0.05143	—
Hexanal	52.00000	1.49160	—	61.00000	1.02869	—
2-Beta-Pinene	81.00000	0.00000	—	59.00000	-1.13156	—
2-Nitrobutane	81.00000	0.00000	—	48.00000	-1.69734	—
3-Carene	81.00000	0.00000	—	67.00000	-0.72008	—
Heptanal	47.00000	1.74877	—	80.00000	-0.05143	—
dl-Limonene	81.00000	0.00000	—	58.00000	1.18299	—
3-methyl-1-butanol	80.00000	-0.05143	—	57.00000	-1.23443	—
2-pentyl-furane	46.50000	1.77449	—	19.00000	-3.18894	**
Ethyl ester hexanoic acid	68.00000	0.66865	—	25.50000	2.85461	**
1-(methylphenyl)-ethanone	65.00000	0.82295	—	56.00000	-1.28586	—
Octanal	36.00000	2.31455	*	67.00000	0.72008	—
1-hexanol	76.00000	-0.25717	—	73.00000	0.41148	—
Nonanal	51.00000	1.54303	—	74.00000	-0.36004	—
1-Heptanol	72.00000	0.46291	—	55.00000	1.33730	—
Decanal	63.00000	0.92582	—	3.00000	-4.01189	***
2-ethyl-1-hexanol	81.00000	0.00000	—	24.50000	2.90605	**
1-octanol	52.00000	1.49160	—	51.00000	-1.54303	—
4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol	52.00000	1.49160	—	79.00000	-0.10287	—
2-decenal	50.00000	1.59447	—	78.00000	0.15430	—

* For $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

volatile compounds presented z-values up to 2.5 (in absolute value), except dl-Limonene, 2-pentyl-furane, decanal and 1-octanol.

According to results obtained for the volatile compounds, the different packaging systems of

non-irradiated and irradiated pork loin were treated separately in fresh and marinated loin.

As far as we are aware, studies about changes in each volatile compound with different irradiation and packaging during storage have not been

previously reported. So, this is the first time that this type of study has been done.

The end of the shelf-life of samples was established when the microbial load reach the value

of 107 cfu g⁻¹ (Cabeza *et al.*, 2007). Accordingly, the shelf-life of both fresh and marinated loin stored under the selected conditions will be different according to the strength of the method of microbiota

Table 6
Significant differences within both types of samples (fresh and marinated) for the volatile compounds classes analyzed according to the different packaging atmosphere (air, MAP and vacuum)

Volatile compounds	Fresh (n = 27)				Marinated (n = 27)			
	H	A/V	A/MAP	V/MAP	H	A/V	A/MAP	V/MAP
2,4-dimethyl-hexane	0.18	ns	ns	ns	3.19	ns	ns	ns
3-methyl-hexane	0.70	ns	ns	ns	0.97	ns	ns	ns
2,5-dimethyl-hexane	0.03	ns	ns	ns	1.34	ns	ns	ns
2,4-dimethyl-heptane	1.10	ns	ns	ns	0.95	ns	ns	ns
2-propanone	3.56	ns	ns	ns	1.76	ns	ns	ns
2-octene	3.43	ns	ns	ns	7.16	ns	ns	ns
Ethyl ester acetic acid	0.17	ns	ns	ns	6.10	ns	ns	ns
2-butanone	1.19	ns	ns	ns	1.86	ns	ns	ns
2-(1-methylethoxy)-1-propanol	8.51	ns	ns	*	1.90	ns	ns	ns
2-hydroxypropanoic acid ethyl ester	0.68	ns	ns	ns	2.04	ns	ns	ns
2-pentanone	2.35	ns	ns	ns	1.48	ns	ns	ns
Pentanal	1.75	ns	ns	ns	1.19	ns	ns	ns
Acetic acid ethenyl ester	3.28	ns	ns	ns	0.58	ns	ns	ns
Chloroform	1.55	ns	ns	ns	1.45	ns	ns	ns
2-butanol	1.58	ns	ns	ns	6.36	ns	ns	ns
Ethyl ester butanoic acid	0.23	ns	ns	ns	3.11	ns	ns	ns
3,5,5-trimethyl-1-hexene	0.69	ns	ns	ns	9.36	ns	**	ns
Dimethyl disulphide	0.83	ns	ns	ns	0.39	ns	ns	ns
Hexanal	0.13	ns	ns	ns	1.17	ns	ns	ns
2-Beta-Pinene	0.00	ns	ns	ns	14.38	ns	*	***
2-Nitrobutane	0.00	ns	ns	ns	5.36	ns	ns	ns
3-Carene	0.00	ns	ns	ns	0.02	ns	ns	ns
Heptanal	0.11	ns	ns	ns	2.25	ns	ns	ns
dl-Limonene	0.00	ns	ns	ns	3.74	ns	ns	ns
3-methyl-1-butanol	6.92	ns	ns	ns	8.65	ns	ns	*
2-pentyl-furane	0.71	ns	ns	ns	1.66	ns	ns	ns
Ethyl ester hexanoic acid	3.01	ns	ns	ns	2.04	ns	ns	ns
1-(methylphenyl)-ethanone	7.41	ns	ns	*	4.12	ns	ns	ns
Octanal	0.07	ns	ns	ns	2.51	ns	ns	ns
1-hexanol	2.57	ns	ns	ns	0.89	ns	ns	ns
Nonanal	1.79	ns	ns	ns	1.45	ns	ns	ns
1-Heptanol	0.27	ns	ns	ns	1.63	ns	ns	ns
Decanal	0.84	ns	ns	ns	0.57	ns	ns	ns
2-ethyl-1-hexanol	0.00	ns	ns	ns	4.71	ns	ns	ns
1-octanol	0.02	ns	ns	ns	3.25	ns	ns	ns
4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol	2.43	ns	ns	ns	1.00	ns	ns	ns
2-decenal	0.05	ns	ns	ns	0.55	ns	ns	ns

ns, not significant; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 air: A; vacuum: V. Comparison between packaging atmospheres using Kruskal-Wallis Test.

inhibition. However, the statistical analysis showed that these differences did not affect to the integrity of most phospholipid classes. Normality of the variables in the comparison groups was studied by

means of Kolmogorov - Smirnov - Lilliefors test. In light of the results of this test, non parametric test, such as Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test were used for all between-group comparisons.

Table 7
Significant differences within both types of samples for the volatile compounds analyzed according to the different irradiation doses (0, 1 and 2 kGy)

Volatile compounds	Fresh(n=27)				Marinated (n=27)			
	H	0/1	0/2	1/2	H	0/1	0/2	1/2
2,4-dimethyl-hexane	0.60	ns	ns	ns	2.03	ns	ns	ns
3-methyl-hexane	1.93	ns	ns	ns	1.59	ns	ns	ns
2,5-dimethyl-hexane	0.64	ns	ns	ns	2.05	ns	ns	ns
2,4-dimethyl-heptane	3.15	ns	ns	ns	0.96	ns	ns	ns
2-propanone	1.11	ns	ns	ns	0.00	ns	ns	ns
2-octene	0.14	ns	ns	ns	0.03	ns	ns	ns
Ethyl ester acetic acid	5.81	ns	ns	ns	0.26	ns	ns	ns
2-butanone	0.02	ns	ns	ns	0.35	ns	ns	ns
2-(1-methylethoxy)-1-propanol	3.83	ns	ns	ns	0.74	ns	ns	ns
2-hydroxypropanoic acid ethyl ester	0.30	ns	ns	ns	0.11	ns	ns	ns
2-pentanone	0.11	ns	ns	ns	1.54	ns	ns	ns
Pentanal	0.52	ns	ns	ns	4.90	ns	ns	ns
Acetic acid ethenyl ester	0.69	ns	ns	ns	0.34	ns	ns	ns
Chloroform	1.88	ns	ns	ns	0.65	ns	ns	ns
2-butanol	1.62	ns	ns	ns	3.18	ns	ns	ns
Ethyl ester butanoic acid	0.54	ns	ns	ns	0.99	ns	ns	ns
3,5,5-trimethyl-1-hexene	2.59	ns	ns	ns	0.93	ns	ns	ns
Dimethyl disulphide	1.50	ns	ns	ns	10.00	ns	*	ns
Hexanal	1.88	ns	ns	ns	0.26	ns	ns	ns
2-Beta-Pinene	0.00	ns	ns	ns	0.40	ns	ns	ns
2-Nitrobutane	0.00	ns	ns	ns	1.93	ns	ns	ns
3-Carene	0.00	ns	ns	ns	2.74	ns	ns	ns
Heptanal	1.91	ns	ns	ns	0.43	ns	ns	ns
dl-Limonene	0.00	ns	ns	ns	0.09	ns	ns	ns
3-methyl-1-butanol	3.24	ns	ns	ns	0.64	ns	ns	ns
2-pentyl-furane	0.67	ns	ns	ns	0.33	ns	ns	ns
Ethyl ester hexanoic acid	0.20	ns	ns	ns	0.24	ns	ns	ns
1-(methylphenyl)-ethanone	0.79	ns	ns	ns	0.26	ns	ns	ns
Octanal	0.85	ns	ns	ns	0.44	ns	ns	ns
1-hexanol	4.60	ns	ns	ns	0.06	ns	ns	ns
Nonanal	4.17	ns	ns	ns	0.68	ns	ns	ns
1-Heptanol	1.45	ns	ns	ns	2.65	ns	ns	ns
Decanal	2.28	ns	ns	ns	0.82	ns	ns	ns
2-ethyl-1-hexanol	0.00	ns	ns	ns	0.39	ns	ns	ns
1-octanol	1.72	ns	ns	ns	0.27	ns	ns	ns
4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol	3.34	ns	ns	ns	0.10	ns	ns	ns
2-decenal	4.26	ns	ns	ns	1.72	ns	ns	ns

ns, not significant; * p<0.01. Comparison between irradiation doses using Kruskal-Wallis Test.

In order to find out significant differences between different volatile compounds for two times values used and both types of samples prepared a Mann-Whitney U test was performed. The statistical parameter U was obtained for each compound and the respective z-values were calculated for being compared with the z-value in the normalized standard distribution for 95% confidence. Table 4 shows the results of this application. It can be observed that significant differences ($p < 0.01$) have been found for 3,5,5-trimethyl-1-hexene and 1-octanol in fresh loin, 2,4-dimethyl-hexane, 2-propanone, 2-butanone, 2-hydroxypropanoic acid ethyl ester, 2-butanol, octanal and nonanal also presents significant differences ($p < 0.05$), all showing a higher level in shelf-life, except 1-octanol, octanal and nonanal. In marinated loin several compounds show significant differences, 3,5,5-trimethyl-1-hexene, 3-methyl-hexane, 2-propanone, ethyl ester acetic acid, 2-butanol, ethyl ester butanoic acid, dimethyl disulfide, 2-pentyl-furane, ethyl ester hexanoic acid, 2-ethyl-hexanol and octanol ($p < 0.05$); 2-pentanone and decanal ($p < 0.01$); 2-octene ($p < 0.005$); chloroform ($p < 0.0005$) and 2-butanone ($p < 0.0001$), showing a lower level in shelf-life, except 2-propanone, 2-octene, ethyl ester acetic acid, 2-butanone, 2-pentanone, decanal and 1-octanol. These increases in aldehydes and ketones can be due to oxidation of fatty acids.

In Table 5, the results obtained from Mann-Whitney U test to study the effect of temperature are presented for both kinds of samples (fresh and marinated). Two temperatures (4 and 8°C) have been applied for the storage. Only significant differences ($p < 0.05$) are observed for 2-propanone, 3,5,5-trimethyl-1-hexene and octanal in fresh loin. There are no references about the effect of temperature in volatile compounds. In marinated loin, significant differences have been found in a large number of compounds, 2-propanone, 2-butanone, 2-butanol ($p < 0.05$), ethyl ester acetic acid, 2-pentyl-furane and ethyl ester hexanoic acid ($p < 0.01$), possibly because of the additives used.

As well, the effect of packaging atmosphere (air, MAP and vacuum) has been studied applying a Kruskal-Wallis test. The results are in Table 6 and it can be deduced that there are significant differences ($p < 0.05$) between MAP and vacuum for 2-(1-methylethoxy)-1-propanol in the case of fresh loin, being the mean value highest in vacuum. This fact has no explanation and no references about it have been found. On the other hand, the packaging atmosphere has a major effect in volatile compounds from marinated loin, for 2-beta-pinene there are significant differences ($p < 0.05$) between MAP and air and ($p < 0.001$) between MAP and vacuum. Also, there are significant differences ($p < 0.01$) between MAP and air for 3,5,5-trimethyl-1-hexene.

Finally, several irradiation doses have been used for both types of loin (0, 1 and 2 kGy). The effect of this was also studied using a Kruskal-Wallis test, whose data are presented in Table 7.

No effect of the irradiation doses (until 2 kGy) on changes in the individual volatile compounds in fresh loin was observed which is a valuable result since E-beam may be applied as a useful tool to extend the shelf-life of fresh loin without alterations. Only significant differences ($p < 0.05$) between 0 and 2 kGy are observed for dimethyl disulfide in marinated loin.

CONCLUSIONS

A study of the effect of E-beam irradiation and packaging on the volatile compounds from fresh and marinated pork loin has been carried out. Some differences were found between samples, namely in terpenes which only were detected in marinated sample due to the seasoning, which included paprika, source of those volatiles. Minor differences were found between the three types of packaging (air, vacuum and carbon dioxide) and storage temperatures (2 and 8°C). However, in the context of the objective of the present work, the result of most concern is that no effect of the irradiation doses was found on changes in the individual volatile compounds in both products, even when 2 kGy was applied. Thus, the E-beams may be a very useful tool to extend the shelf-life of fresh and marinated pork loin. Additionally, this technology reduces the number of pathogens to negligible levels.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. J.A. Ordóñez for his help and advising. This study was supported by projects P08-AGR-03498, AGL-2007-65235-C02-02 and CSD 2007-00016 of the program CONSOLIDER INGENIO 2010.

REFERENCES

- Ahn DU, Olson DG, Jo C, Chen X, Wu C, Lee JI. 1998. Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production and color in raw pork patties. *Meat Sci.* **49**, 27-39.
- Ahn DU, Jo C, Du M, Olson DG, Nam KC. 2000. Quality characteristics of pork patties irradiated and stored in different packaging and storage conditions. *Meat Sci.* **56**, 203-209.
- Ahn DU, Nam KC, Du M, Jo C. 2001. Volatile production in irradiated normal, pale soft exudative (PSE), and dark firm dry (DFD) pork under different packaging and storage conditions. *Meat Sci.* **57**, 419-426.
- Ahn DU, Lee EJ. 2004. Mechanisms and prevention of off-odor production and color changes in irradiated meat. Irradiation of food and packaging: recent developments. *Am. Chem. Soc.* **875**, 43-76.
- Cabeza MC, Cambero MI, Hoz L, Ordóñez JA. 2007. Optimization of Ebeam treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. In: *Food Sci. Emer. Technol.* **8**, 299-305.
- Cabeza MC, Hoz L, R. Velasco, Cambero MI, Ordóñez JA. 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry

- fermented sausages subjected to E-beam radiation. *Meat Sci.* **83**, 320-327.
- Chouliara I, Samelis I, Kakouri A, Badeka A, Savvaidis IN, Riganakos K. 2006. Effect of irradiation of frozen meat/fat trimmings on microbiological and physicochemical quality attributes of dry fermented sausages. *Meat Sci.* **74**, 303-311.
- García-Márquez I, Cambero MI, Ordóñez JA, Cabeza MC. 2012a. Shelf-Life Extension and Sanitation of Fresh Pork Loin by E-Beam Treatment. *J. Food Protect.* (doi: 10.43 15/0362-028X.JFP-12-217).
- García-Márquez I, Ordóñez JA, Cambero MI and Cabeza MC. 2012b. Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin. *Int. J. Microbiol.* doi: 10.1155/2012/962846.
- Grant IR, Patterson MF. 1991. Effects of irradiation and modified atmosphere packaging on the microbiological safety of minced pork stored under temperature abuse conditions. *Inter. J. Food Sci. Technol.* **26**, 521-533.
- Grant IR, Patterson MF. 1992. Sensitivity of foodborne pathogens to irradiation in the components of a chilled ready meal. *Food Microbiol.* **9**, 95-103.
- Groninger HS, Tappel AL, Knapp FW. 1956. Some chemical and organoleptic changes in gamma irradiated meats. *Food Res.* **21**, 555-564.
- Hampson JW, Fox JB, Lakritz L, Thayer DW. 1996. Effect of low dose gamma radiation on lipids in five different meats. *Meat Sci.* **42**, 271-276.
- Hashim IB, Resurreccion AVA, MaWatters KH. 1995. Disruptive sensory analysis of irradiated frozen or refrigerated chicken. *J. Food Sci.* **60**, 664-666.
- Huang YC, Li HJ, He ZF, Wang T, Qin G. 2010. Study on the flavor contribution of phospholipids and triglycerides to pork. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 1267-1276.
- Huber W, Brasch A, Waly A. 1953. Effect of processing conditions on organoleptic changes in foodstuffs sterilized with high intensity electrons. *Food Technol.* **7**, 109-115.
- International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF) 1996. Salmonellae. In ICMSF (Ed.). Microorganisms in foods, Microbiological specifications of food pathogens (Vol. 5, pp. 217-264). New York: Academic Press.
- Jo C, Lee JI, Ahn DU. 1999. Lipid oxidation, color changes and volatile production in irradiated pork sausage with different fat content and packaging during storage. *Meat Sci.* **51**, 355-361.
- Jo C, Ahn DU. 2000. Production of volatile compounds from irradiated oil emulsions containing amino acids or proteins. *J. Food Sci.* **65**, 612-616.
- Katusin-Razem B, Mihaljevic B, Razem D. 1992. Time-dependent post irradiation oxidative chemical changes in dehydrated egg products. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1948-1952.
- Kim JH, Lee JW, Shon SH, Jang A, Lee KT, Lee M, JO C. 2008. Reduction of volatile compounds and off-odor in irradiated ground pork using acharcoal packaging. *J. Muscle Foods* **19**, 194-208.
- Lee M, Sebranek J, Parrish FC. 1996a. Accelerated post-mortem aging of beef utilizing electron-beam irradiation and modified atmosphere packaging. *J. Food Sci.* **61**, 133-136.
- Lee M, Sebranek JG, Olson DG, Dickson JS. 1996b. Irradiation and packaging of fresh meat and poultry. *J. Food Protect.* **59**, 62-72.
- Lorenz G, Stern DJ, Flath RA, Haddon WF, Tillin SJ, Teranishi R. 1983. Identification of sheep liver volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 1052-1057.
- Luchsinger SE, Kropf DH, García Zepeda CM, Chambers ME, Hollingsworth ME, Hunt MC, Marsden JL, Kastner CL, Kuecker WG. 1996. Sensory analysis and consumer acceptance of irradiated boneless pork chop. *J. Food Sci.* **61**, 1261-1266.
- Luchsinger SE, Kropf DH, Garcia-Zepeda CM, Hunt MC, Stroda SL, Marsden JL. 1997. Color and oxidative properties of irradiated whole muscle beef. *J. Muscle Foods* **8**, 427-443.
- Merritt C, Angelini P, Wierbicki E, Shultz GW. 1975. Chemical changes associated with flavor in irradiated meat. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 1037-1041.
- Monk JD, Beuchat LR, Doyle MP. 1995. Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. *J. Food Protect.* **58**, 197-208.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación MAPA. 2006. «Guía de mejores técnicas disponibles del sector porcino».
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación MAPA. 2005. «El sector de la carne en cifras principales indicadores económicos en 2005». 2006. Subd. Gral. Porcino, Avicultura y otras producciones Ganaderas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2005).
- Narváez-Rivas M, Vicario I, Alcalde MJ, León-Camacho M. 2010. Volatile hydrocarbon profile of Iberian dry-cured hams. a possible tool for authentication of hams according to the fattening diet. *Talanta* **81**, 1224-1228.
- Patterson MF, Damoglou AP, Buick RK. 1993. Effects of irradiation dose and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on poultry meat. *Food Microbiol.* **10**, 197-203.
- Patterson RLS, Stevenson MH. 1995. Irradiation-induced off-odor in chicken and its possible control. *British Poultry Sci.* **36**, 425-441.
- Patterson MF. 1988. Sensitivity of bacteria to irradiation of poultry meat under various atmospheres. *Letters in Applied Microbiol.* **17**, 55-58.
- Reineccius, GA. 1979. Symposium on meat flavor. Off-flavors in meat and fish. A review. *J. Food Sci.* **44**, 12-21.
- Samelis J, Kakouri A, Savvaidis IN, Riganakos K, Kontominas MG. 2005. Use of ionizing radiation doses of 2 and 4 kGy to control *Listeria* spp. And *Escherichia coli* O157:H7 on frozen meat trimmings used for dry fermented sausage production. *Meat Sci.* **70**, 9-195.
- Schweigert BS, Doty DM, Niven CF. 1954. A summary of studies on the irradiation of meats. In Radiation sterilization: review of the literature in selected fields. Chicago quartermaster depot. Chicago, IL: U.S. Army.
- Selke E, Rohwedder WK, Dutton HJ. 1980. Volatile components from trilinolein heated in air. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **57**, 75.
- Selke E, Rohwedder WK, Dutton HJ. 1977. Volatile components from trilinolein heated in air. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54**, 62.
- Shahidi F. (1994). Flavor of meat and meat products—an overview. In F. Shahidi (Ed.), Flavor of meat and meat products (pp. 1-3). London: Blackie Academic and Professional.
- Sommers C, Fan X, Niemira BA, Sokorai K. 2003. Radiation (gamma) resistance and postirradiation growth of *Listeria monocytogenes* suspended in beef bologna containing sodium diacetate and potassium lactate. *J. Food Protect.* **66**, 2051-2056.
- Tarkowski JA, Stoffer SCC, Beumer RR, Kampelmacher EH. 1984. Low dose gamma irradiation of raw meat.

- I. Bacteriological and sensory effects in artificially contaminated samples. *Inter. J. Food Microbiol.* **1**, 13-23.
- Thayer DW, Boyd G, Muller WS, Lipson CA, Hayne WC, Baer SH. 1990. Radiation resistance of Salmonella. *J. Ind. Microbiol.* **5**, 383-390.
- Thayer DW. 1993. Extending shelf life of poultry and read meat by irradiation processing. *J. Food Protect.* **56**, 831-833.
- Ye-Chuan H, Hong-Jun L, Zhi-Fei H, Ting W, Gang Q. 2010. Study on the Flavor Contribution of Phospholipids and Triglycerides to Pork. *Food Sci Biotechnol*, **19**, 1267-1276.
- Zhu M, Du M, Cordray J, Ahn DU. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Food Sci. Food Saf.* **4**, 34-42.

Recibido: 23/11/12
Aceptado: 15/1/13

ARTÍCULO 5

Characterization and quantification of the cholesterol oxidation product fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage

Aceites y grasas. 2013. 65, e045

Doi: <http://dx.doi.org/10.398/gya.0465141>

Characterization and quantification of the cholesterol oxidation product fraction of the intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage

I. García-Márquez^b, M. Narváez-Rivas^a, E. Gallardo^a, J.A. Ordoñez^b and M. León-Camacho^{a,✉}

^aLipid Characterization and Quality Department. Instituto de la Grasa (C.S.I.C.). Spain

^bDepartment of Nutrition, Bromatology and Food Technology Faculty of Veterinary, University Complutense, Avda. Puerta de Hierro, S/N, E-28040 Madrid, Spain

✉Corresponding author: mleon@cica.es

Submitted: 24 April 2014; Accepted: 09 June 2014

SUMMARY: A study of the effect of E-beam (1 and 2 kGy) on the cholesterol oxidation product (COP) composition of fresh and marinated pork loin stored at 4 and 8 °C under different atmospheres (air, vacuum and carbon dioxide enriched) has been carried out for the first time. The combined statistical treatment of the distinct variables showed that minor differences were found in some cholesterol oxidation products of fresh loin due to storage temperature, packaging method and storage time. No effect of irradiation (up to 2 KGy) on the COP amount was found, concluding that E-beam can be a useful tool to extend the shelf-life of fresh and marinated loin without changes in the COP fraction.

KEYWORDS: Cholesterol oxidation products; E-beam irradiation; Fresh loin; Intramuscular fat; Marinated loin; Packaging

RESUMEN: *Caracterización y cuantificación de los productos de oxidación del colesterol de la grasa intramuscular del lomo de cerdo (fresco y adobado) con diferentes irradiaciones y empaquetados durante el almacenamiento.* Se ha realizado un estudio sobre el efecto de la radiación de electrones (E-beam) (1 y 2 kGy) sobre los compuestos de oxidación del colesterol (COPs) del lomo de cerdo almacenado a 4 y 8 °C bajo diferentes atmósferas (aire, vacío y dióxido de carbono). Este tipo de estudio ha sido llevado a cabo por primera vez en este tipo de muestras. El tratamiento estadístico combinado de distintas variables muestra que se producen cambios menores en algunos COPs en el lomo fresco debido a la temperatura de almacenamiento al método de empaquetado y al tiempo de almacenamiento. No hubo efecto de la dosis de radiación (hasta 2 KGy) en los COPs, por lo que la radiación E-beam puede ser una herramienta útil para prolongar la vida útil del lomo fresco y adobado sin producir cambios en la composición de los COPs.

PALABRAS CLAVE: *Compuestos de oxidación del colesterol; Grasa intramuscular; Lomo adobado; Lomo fresco; Radiación E-beam; Sistema de empaquetado*

Citation/Cómo citar este artículo: García-Márquez I, Narváez-Rivas M, Gallardo E, Ordoñez J.A, León-Camacho M. 2014. Characterization and quantification of the cholesterol oxidation product fraction of the intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage. *Grasas Aceites* 65 (4): e045. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0465141>.

Copyright: © 2014 CSIC. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial (by-nc) Spain 3.0 Licence.

1. INTRODUCTION

Pork production has a great importance in human nutrition because it provides more than 39% of the global production of meat for human

consumption, equivalent to 15.3 kg of meat per person per year (FAOSTAT 2004). The global pig population in 2002 was 956 million heads with an upward trend, due mainly to consumption in China (FAOSTAT 2004). The distribution of the census

is very heterogeneous, and is concentrated mostly in Asia (60%), especially in China (47% of world census), followed by Europe (21%), U.S. (9%) and Brazil (4%). In Spain, the farmed pig is the number one breed in volumes of animals and tons of meat produced. This country is the 2nd largest European producer, its production was 3.5 million tons in 2008 (MAPA 2006).

Cholesterol is a steroid of animal origin that has numerous metabolic functions. Although cholesterol is a relatively stable compound, it can be oxidized under harsh conditions, high processing temperatures, like cooking, and during the storage and packaging of products of animal origin (Paniangvait *et al.*, 1995; Penazzi *et al.*, 1995; Dionisi *et al.*, 1998). Cholesterol oxidation reactions give rise to a wide range of secondary products generically called Cholesterol oxidation products (COPs).

The factors contributing to the formation of COPs are as follows: presence of oxygen (free radical oxidation), light (photo-oxidation), and high temperatures (enzymatic oxidation). (Ubhayasekera *et al.*, 2009). Thus, the use of packaging materials capable of avoiding the entrance of air and light, along with the use of proper storage temperature, could delay their formation (Savage *et al.*, 2002; Paniangvait *et al.*, 1995). COPs are considered more harmful than cholesterol and they have been shown to be cytotoxic, atherogenic, mutagenic and carcinogenic (Park *et al.*, 1985, Smith *et al.*, 1980, Kubow *et al.*, 1990; Sevanian *et al.*, 1986; Leonarduzzi *et al.*, 2002).

The mechanism of COP action seems to be related to the bioavailability (Lund *et al.*, 1994) and dietary uptake of cholesterol (Peng *et al.*, 1985). COPs also impair membrane function, perturbing permeability, stability and other properties (Hennig *et al.*, 1987; Guardiola *et al.*, 1996). They contribute to the development of atherosclerosis due to their negative influence on the permeability of blood vessels and the synthesis of prostaglandins along with thrombocyte aggregation (Guardiola *et al.*, 1996). So, a high consumption of COPs has an adverse effect on human health.

The most common products of cholesterol oxidation in foods are: 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, 5 α ,6 α -epoxycholesterol, 5 β , 6 β -epoxycholesterol, 7-ketocholesterol and cholestanetriol (Derewiaka *et al.*, 2010).

Currently, there is a good method for sanitizing food which could be accepted in food safety. This is the use of E-beam radiation. Irradiation is applied to improve the microbial safety of meat, but it can also be the precursor to the formation of COPs, because it increases fatty acid oxidation in the meat system. It has been found that the amount of cholesterol oxidation depends on the applied dose (Lebovics *et al.*, 1992). The packaging and storage conditions after the irradiation treatment are also

important (Ahn *et al.*, 1998). In this way, the quality of the meat may be more or less affected, depending on dose, temperature and atmosphere during the treatment and storage conditions (Ahn *et al.*, 1998).

At the present time in the European Union, "dried herbs, spices and vegetable seasonings" are the only food ingredients that can be treated with ionizing radiation, as established by the Directives 1999/2/EC (EC, 1999a) and 1999/3/EC (EC, 1999b). The treatment with E-beam radiation of meat and meat products has not been authorized, except for some meats in several countries, such as chicken meat in The Netherlands, poultry in France and The United Kingdom, and the mechanically separated meat of poultry in Belgium and France (EC, 2002). The Food and Drug Administration (FDA) and The U. S. Department of Agriculture (USDA) have approved the treatment of spices, fruits, vegetables, wheat and wheat flour in pork, chicken and red meat (IFT, 1999; Anón., 2000).

The presence of COPs in meat and meat products, coupled with their proven harmful biological activity, has promoted the realization of extensive research to understand the formation mechanism of these compounds and to determine the effect on health from its intake. In several studies, their analysis was done by gas chromatography (GC) and previous purification by solid phase extraction (SPE). Hwang *et al.*, (1993) developed a methodology capable of measuring low concentrations of COPs in irradiated and non-irradiated meat (pork and beef). The aim of the study done by Ubhayasekera *et al.* (2004) was to obtain a method for the purification and enrichment of COPs, using different methods of saponification and transesterification of lipids in tallow. In such study, the analysis of COPs was done using four different methods, in which cold and hot saponification and transesterification were used.

The aim of this work is to investigate the effect of electron-beam irradiation on the oxidation of cholesterol in raw and marinated pork loin with different packaging (García-Márquez *et al.*, 2013a) and storage times.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents and standards

Hexane, a fraction from petroleum, Multisolvant TM HPLC ACS grade supplied by Scharlau (Barcelona, Spain) was distilled through a fractionation column. Chloroform, methanol, diethyl ether and potassium hydroxide for analysis grade were provided by Merck (Darmstadt, Germany).

Acetone and pyridine anhydrous for analysis grade were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Chlorotrimethylsilane and hexamethyldisilazane were supplied by Fluka (Seelze, Germany)

and betulin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used as an internal standard. All other materials were analytical grade.

Cholesterol and the standards used for the identification of COPs, cholestane-5 α -6 α -epoxide, cholestane-3 β -5 α -6 β -triol, 25-hydroxycholesterol and 5-cholesten-3 β -ol-7-one, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Samples and sample treatments

A total of fifty-four samples of fresh and marinated (prepared with the addition of salts, ascorbic acid, nitrifying, garlic, paprika and others) loin from castrated male white pigs were used. Table 1 shows the treatments applied and the identification code assigned to each one. The lipids were obtained from 10 grams of each sample by extraction with chloroform-methanol (2:1 v/v) according to the procedure described by Folch *et al.* (1957). The samples were cut up into small pieces and homogenized before extraction with 3 \times 50 mL of solvent using an agitator, then 100 mL distilled water was added. The chloroform solution was filtered over anhydrous sodium sulphate, and the samples were extracted with 3 \times 50 mL of diethyl ether. The extracts were combined with the chloroform solution and then evaporated to dryness in a rotary evaporator at 30 °C under reduced pressure.

The unsaponifiable fraction was extracted according to the method of Narváez-Rivas *et al.* (2014). Fat (0.2 g) was placed in a glass Pyrex tube where 1 mL of internal standard solution (0.16 mg mL⁻¹ of chloroform) was previously added and evaporated under nitrogen. The mixture was saponified with

5 mL of ethanolic potassium hydroxide (2M) that contained 20% (v/v) water in an oven with air circulation and heated at 85 °C for 45 min. After cooling at room temperature, 10 mL distilled water was added and the solution was transferred to a 50-mL decanting funnel prior to extraction. Then, the mixture was extracted with three 10 mL portions of diethyl ether. The extracts were combined in another funnel and were washed several times with 10-mL portions of distilled water, until the wash was at a neutral pH. The solution of diethyl ether and COPs was dried over anhydrous sodium sulphate and evaporated to dryness in a rotary evaporator at 30 °C under reduced pressure.

The COP fraction was separated from the unsaponifiable fraction by means of Solid Phase Extraction (SPE) according to the method previously described (Narváez-Rivas *et al.*, 2014). The complete unsaponifiable fraction was dissolved in approximately 0.5 mL of hexane/diethyl ether (75:25, v/v) and transferred to a silica gel bonded column, Supelclean LC-Si, 6 mL volume; 500 mg sorbent (Supelco Bellefonte, PA, USA) which was previously conditioned with 10 mL n-hexane. The column was washed with 4 mL n-hexane:diethyl ether (75:25 v/v) to remove the compounds with minor polarity, and then, the COPs were eluted with 3 mL n-hexane:diethyl ether (60:40 v/v) and 4 mL of acetone: methanol (60:40 v/v). Both recovered fractions were combined and evaporated to dryness in a rotary evaporator at 30 °C under reduced pressure. Trimethylsilyl ether (TMSE) derivatives were prepared by adding 0.15 mL of Pyridine: Chlorotrimethylsilane: hexamethyldisilazane (9:3:1, v/v/v) at room temperature for 20 min.

TABLE 1. Analyzed intramuscular fat from pork loin samples

Code	Type	Temperature (°C)	Atmosphere	Radiation (kGy)	Time (days)
1F	Fresh	4	Air	0	0
2F	Fresh	4	Air	1	0
3F	Fresh	4	Air	2	0
4F	Fresh	4	Vacuum	0	0
5F	Fresh	4	Vacuum	1	0
6F	Fresh	4	Vacuum	2	0
7F	Fresh	4	MAP	0	0
8F	Fresh	4	MAP	1	0
9F	Fresh	4	MAP	2	0
10F	Fresh	4	Air	0	10
11F	Fresh	4	Air	1	10
12F	Fresh	4	Air	2	10
13F	Fresh	4	Vacuum	0	10

TABLE I. (Continued)

Code	Type	Temperature(°C)	Atmosphere	Radiation (kGy)	Time (days)
14F	Fresh	4	Vacuum	1	10
15F	Fresh	4	Vacuum	2	10
16F	Fresh	4	MAP	0	10
17F	Fresh	4	MAP	1	10
18F	Fresh	4	MAP	2	10
19F	Fresh	8	Air	0	10
20F	Fresh	8	Air	1	10
21F	Fresh	8	Air	2	10
22F	Fresh	8	Vacuum	0	10
23F	Fresh	8	Vacuum	1	10
24F	Fresh	8	Vacuum	2	10
25F	Fresh	8	MAP	0	10
26F	Fresh	8	MAP	1	10
27F	Fresh	8	MAP	2	10
1M	Marinated	4	Air	0	0
2M	Marinated	4	Air	1	0
3M	Marinated	4	Air	2	0
4M	Marinated	4	Vacuum	0	0
5M	Marinated	4	Vacuum	1	0
6M	Marinated	4	Vacuum	2	0
7M	Marinated	4	MAP	0	0
8M	Marinated	4	MAP	1	0
9M	Marinated	4	MAP	2	0
10M	Marinated	4	Air	0	10
11M	Marinated	4	Air	1	10
12M	Marinated	4	Air	2	10
13M	Marinated	4	Vacuum	0	10
14M	Marinated	4	Vacuum	1	10
15M	Marinated	4	Vacuum	2	10
16M	Marinated	4	MAP	0	10
17M	Marinated	4	MAP	1	10
18M	Marinated	4	MAP	2	10
19M	Marinated	8	Air	0	10
20M	Marinated	8	Air	1	10
21M	Marinated	8	Air	2	10
22M	Marinated	8	Vacuum	0	10
23M	Marinated	8	Vacuum	1	10
24M	Marinated	8	Vacuum	2	10
25M	Marinated	8	MAP	0	10
26M	Marinated	8	MAP	1	10
27M	Marinated	8	MAP	2	10

2.3. COP analysis

The different COPs were analyzed by GC according to the method previously described (Narváez-Rivas *et al.*, 2014). The GC system consisted of an Agilent (Palo Alto, CA, USA) 7890A gas chromatograph, equipped with a cold-on column injector and a flame ionization detector; a capillary SPB-5 column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA) and an Agilent G 4513A automatic injector were used. Hydrogen was used as carrier gas at 10 psi constant head pressure. The programming sequence for the GC oven temperature was as follows: an initial temperature of 90 °C held for 0.5 min and increased to 290 °C at a rate of 30.0 °C \cdot min⁻¹. Once the column reached 290 °C, the temperature was increased to 300 °C at a rate of 1.0 °C min⁻¹ and held for a total running time of 25 min. The injector was operated in the splitless mode at 350 °C with a purge flow to split vent of 15 mL \cdot min⁻¹ at 0.5 min. The detector temperature was 360 °C, and air and hydrogen had flow rates of 300 and 30 mL \cdot min⁻¹ to the detector respectively, which had an auxiliary flow of 30 mL \cdot min⁻¹ of nitrogen.

In order to identify the COPs, an experiment was conducted using a Varian-CP3800 gas chromatograph coupled to a Saturn 2000 ion trap mass spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA). The GC was equipped with a CP8400 autosampler. Separation was accomplished on a DB-5MS capillary column (30 m long \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA) with a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ using ultra high purity hydrogen as the carrier gas. The injector temperature was 350 °C. Splitless injection mode was used with a ratio of 1:10 at 0.5 min and the injection volume was 1 μ L. The programming sequence for the GC oven temperature was the same as for GC-FID. Once the column reached 290 °C, the temperature was increased to 300 °C at a rate of 1.0 °C \cdot min⁻¹ and for 7.833 min for a total running time of 25 min. The MS conditions were as follows: transfer line maintained at 290 °C; electronic ionization mode at an ionization voltage of 70 eV; scan rate of 1.0 sec scan⁻¹; m/z range of 25–550 amu and manifold temperature of 180 °C. The dwell time and inter-channel delay was 0.08 secs and 0.02 secs, and the emission current was 10 μ A. Varian Mass Spectrometry Workstation version 6.30 software was used for data acquisition and processing of the results.

2.4. Quantitative analysis and statistical treatment

Seven COPs were identified. The peak area of each COP was used as the analytical signal. The quantification for each different COP was carried out using betulin as internal standard.

The COPs identified were considered as chemical descriptors. A data matrix, whose rows are the

samples and whose columns are the variables, was built. Each element of this matrix x_{ij} corresponds to the content of COP j for the sample i . A statistical analysis based on non-parametric techniques was used, including the Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors test, which was used to evaluate the normality of each variable included in the study. Since the data distribution was not normal, non-parametric tests were applied. The Kruskal-Wallis test was used to determine significant differences for the variables with three levels. This test is considered as an ANOVA test for one factor. The Mann-Whitney U test was used to determinate the differences between two levels of a same variable. This test is considered similar to a Student t-test for independent sample groups. The calculations were made using the statistical package CSS: STATISTICA from Statsoft™ (Tulsa, OK, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Identification of components

The peak of COPs identified, the relative retention times (TRR) to betulin, the base peak and the molecular ion for their trimethyl silyl ethers are shown in Table 2. These indicate that there was good separation among the different compounds using this method. The compounds elute between 15 and 25 min. This method is very suitable for the analysis of COPs in these types of samples.

Seven compounds have been identified in the COP fraction of the lipid fraction from fresh and marinated loin. Identification of the peaks was carried out using a GC ion-trap-MS and comparing the spectra to those from the NIST (National Institute of Standards and Technology) and Wiley libraries and verified by standards (as TMSE derivatives).

3.2. COPs in fresh and marinated loin

Table 3 shows the mean minimum and maximum values of the COPs analyzed in the loin (as mg \cdot Kg⁻¹ of fat) corresponding to the fresh and marinated pork. In this table, it can be observed

TABLE 2. COPs identified in the fresh and marinated loin

Compound	TRR	Base peak	M+
cholest-5-en-3 β ,7 α -diol	0.62		546
cholest-5-en-3 β ,7 β -diol	0.70		546
cholestane-5 β ,6 β -epoxide	0.72		472
cholestane-5 α ,6 α -epoxide	0.75	367	472
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	0.81	456	636
cholest-5-en-3 β ,25-diols	0.86	131	546
5-cholesten-3 β -ol-7-one	0.88	473	472

TABLE 3. Means and ranges for the COPs (mg·Kg⁻¹ of fat) determined in the analyzed loin samples and Mann-Whitney U Test By variable. Type Marked tests are significant at p<0.05

	Fresh (n = 27)	Marinated (n = 27)	U	Z
cholest-5-en-3 β ,7 α -diol	228.63 (0.00-2100.79)	125.68 (0.00-315.55)	304.0000	-1.04665
cholest-5-en-3 β ,7 β -diol ^a	332.14 (61.36-2481.65)	169.72 (38.56-879.86)	239.0000	2.17115
cholestane-5 β ,6 β -epoxide ^b	85.79 (0.00-1069.54)	20.75 (0.00-119.07)	211.0000	2.65555
cholestane-5 α ,6 α -epoxide	191.59 (27.45-1225.70)	132.85 (27.15-510.64)	360.0000	-0.07785
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	133.26 (0.00-2231.05)	52.01 (0.00-316.34)	288.0000	1.32345
cholest-5-en-3 β ,25-diol	273.14 (0.00-2134.20)	9.45 (0.00-79.74)	336.5000	0.48440
5-cholesten-3 β -ol-7-one	270.08 (0.00-3221.27)	114.02 (0.00-530.08)	350.5000	0.24220
Total	1241.49 (140.38-12330.01)	615.03 (182.08-1920.57)	308.0000	0.97745

^afor p<0.05; ^bfor p<0.01

that all COPs were detected in both types of samples (fresh and marinated loin).

The most abundant COP was cholest-5-en-3 β ,7 β -diol, with average values of 332.14 mg·Kg⁻¹ in fresh loin and 169.72 mg·Kg⁻¹ in marinated loin. The other major COP was cholest-5-en-3 β ,25-diol in fresh loin with an average value of 273.14 mg·Kg⁻¹ and cholestane-5 α ,6 α -epoxide in marinated loin with an average value of 132.85 mg·Kg⁻¹. The total amount of COPs in fresh loin was much higher (1241.49 mg·Kg⁻¹) than those found in marinated loin (615.03 mg·Kg⁻¹). In addition, the amounts of every COP were higher in fresh than in marinated loin, but there is only a significant increase in two of them: cholest-5-en-3 β ,7 β -diol (p<0.05) and cholestane-5 β ,6 β -epoxide (p<0.01). This protective effect was also observed when some antioxidants, like vitamin C, vitamin E, BHA and trolox were used in marinated pork (Lee *et al.*, 2008). The addition of onion and garlic caused a decrease in 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol concentrations in pork meat (Janoszca, 2010). The Mann-Whitney U test was performed to determine significant differences between the two types of loin. The statistical parameter U was obtained for each compound and the respective z-values were calculated for comparison with the z-value in the normalized standard distribution for 95% confidence (z = 1.96). The results of this test are also shown in table 3. It can be observed that the obtained z-values were higher than the critical one for cholest-5-en-3 β ,7 β -diol and cholestane-5 β ,6 β -epoxide, which showed the greatest differences with z-values higher than the critical one (2.17 and 2.66 respectively). The other COPs presented z-values below 1.3 (in absolute value), lower than the critical one.

According to the results obtained for the different COPs, the different packaging systems of non-irradiated and irradiated pork loin were treated separately in fresh and marinated loin, as was done for phospholipids (García-Márquez *et al.*, 2013a) and volatile compounds (García-Márquez *et al.*, 2013b) in previous works.

3.3. Effect of different treatment and storage conditions

The end of the shelf-life of samples was established when the microbial load reached the value of 107 cfu/g (Cabeza *et al.*, 2007). Accordingly, the shelf-life of both fresh and marinated loin stored under the selected conditions will be different according to the strength of the method of microbiota inhibition. However, the statistical analysis showed that these differences did not affect to the integrity of most COPs. The normality of the variables in the comparison groups was studied by means of the Kolmogorov - Smirnov - Lilliefors test. In light of the results of this test, a non parametric test such as the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test were used for all between-group comparisons.

In order to find out significant differences between different COPs for the two different storage times used (0 and 10 days) and both types of samples, a Mann-Whitney U test was performed. The statistical parameter U was obtained for each compound and the respective z-values were calculated for comparison with the z-value in the normalized standard distribution for 95% confidence. Table 4 shows the results of this test. It can be observed that significant differences (p<0.01) have been found for cholest-5-en-3 β ,25-diol in fresh loin (showing a higher level in shelf-life). Cholestane-5 α ,6 α -epoxide also presents significant differences (p<0.05). However, no compound shows significant differences in marinated loin. Nam *et al.* (2001) detected higher amounts of 7 α - or 7 β -hydroxycholesterol and total COPs in raw pork after 7 days of storage.

In Table 5, the results obtained from the Mann-Whitney U test to study the effect of temperature are presented for both kinds of samples (fresh and marinated). Two temperatures (4 and 8 °C) have been applied for the storage. Only significant differences (p<0.05) are observed for cholest-5-en-3 β ,25-diol in fresh loin. There are no references about the effect of temperature in COPs. In marinated loin,

significant differences have not been found in any compound, possibly because of the additives used.

In addition, the effect of packaging atmosphere (air, modified atmosphere packaging (MAP) and vacuum) has been study applying a Kruskal-Wallis test. The results are in Table 6 and it can be deduced that there are significant differences ($p < 0.05$) between MAP and air for cholest-5-en-3 β ,7 β -diol

in the case of fresh loin, with the mean value at its highest in air. This fact is in agreement with the expected result and with that observed by Nam *et al.* (2001). They found that aerobically packaged and irradiated meats had higher COP values (Nam *et al.*, 2001). On the other hand, the packaging atmosphere has no effect on the COPs from marinated loin.

TABLE 4. Mann-Whitney U Test by variable time for both types of samples

COPs	Fresh (n = 27)			Marinated (n = 27)		
	U	Z	p-level	U	Z	p-level
cholest-5-en-3 β ,7 α -diol	46.50000	1.77449	–	66.00000	0.77152	–
cholest-5-en-3 β ,7 β -diol	43.00000	1.95451	–	56.00000	–1.28586	–
cholestane-5 β ,6 β -epoxide	54.50000	1.36301	–	75.50000	0.28289	–
cholestane-5 α ,6 α -epoxide	32.00000	2.52029	*	58.00000	–1.18299	–
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	70.00000	0.56578	–	69.00000	–0.61721	–
cholest-5-en-3 β ,25-diol	0.00000	4.16619	**	74.00000	–0.36004	–
5-cholesten-3 β -ol-7-one	76.00000	0.25717	–	72.00000	–0.46291	–

*For $p < 0.05$ and ** for $p < 0.001$.

TABLE 5. Mann-Whitney U Test by variable temperature for both types of samples

COPs	Fresh (n = 27)			Marinated (n = 27)		
	U	Z	p-level	U	Z	p-level
cholest-5-en-3 β ,7 α -diol	46.50000	1.774489	–	62.00000	–0.97725	–
cholest-5-en-3 β ,7 β -diol	58.00000	1.182992	–	64.00000	–0.87439	–
cholestane-5 β ,6 β -epoxide	50.50000	1.568751	–	80.00000	–0.05143	–
cholestane-5 α ,6 α -epoxide	57.00000	1.234427	–	79.00000	–0.10287	–
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	77.00000	–0.205738	–	46.00000	–1.80021	–
cholest-5-en-3 β ,25-diol	36.00000	2.314550	*	58.00000	–1.18299	–
5-cholesten-3 β -ol-7-one	81.00000	0.000000	–	68.00000	–0.66865	–

*For $p < 0.05$.

TABLE 6. Significant differences within both types of samples (fresh and marinated) for the COPs analyzed according to the different packaging atmosphere (air, MAP and vacuum)

COPs	Fresh (n = 27)				Marinated (n = 27)			
	H	A/V	A/MAP	V/MAP	H	A/V	A/MAP	V/MAP
cholest-5-en-3 β ,7 α -diol	0.41	ns	ns	ns	0.90	ns	ns	ns
cholest-5-en-3 β ,7 β -diol	6.40	ns	*	ns	0.17	ns	ns	ns
cholestane-5 β ,6 β -epoxide	1.40	ns	ns	ns	0.91	ns	ns	ns
cholestane-5 α ,6 α -epoxide	3.24	ns	ns	ns	0.47	ns	ns	ns
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	1.01	ns	ns	ns	2.89	ns	ns	ns
cholest-5-en-3 β ,25-diol	0.74	ns	ns	ns	2.41	ns	ns	ns
5-cholesten-3 β -ol-7-one	0.99	ns	ns	ns	0.52	ns	ns	ns

ns, not significant; * for $p < 0.05$; air: A; vacuum: V. Comparison between packaging atmospheres using Kruskal-Wallis Test.

TABLE 7. Significant differences within both types of samples for the COPs analyzed according to the different irradiation doses (0, 1 and 2 kGy)

COPs	Fresh(n = 27)				Marinated (n = 27)			
	H	0/1	0/2	1/2	H	0/1	0/2	1/2
cholest-5-en-3 β ,7 α -diol	2.08	ns	ns	ns	2.14	ns	ns	ns
cholest-5-en-3 β ,7 β -diol	0.79	ns	ns	ns	0.14	ns	ns	ns
cholestane-5 β ,6 β -epoxide	0.87	ns	ns	ns	1.53	ns	ns	ns
cholestane-5 α ,6 α -epoxide	0.23	ns	ns	ns	0.46	ns	ns	ns
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	1.82	ns	ns	ns	0.24	ns	ns	ns
cholest-5-en-3 β ,25-diols	0.29	ns	ns	ns	5.72	ns	ns	ns
5-cholesten-3 β -ol-7-one	1.34	ns	ns	ns	2.23	ns	ns	ns

ns, not significant. Comparison between irradiation doses using Kruskal-Wallis Test.

Finally, several irradiation doses have been used for both types of loin (0, 1 and 2 kGy). The effect of this was also studied using a Kruskal-Wallis test, whose data are presented in Table 7. No effect of the irradiation doses (up to 2 kGy) on the changes in the individual COPs in fresh and marinated loin was observed, which is a valuable result since E-beam may be applied as a useful tool for extending the shelf-life of fresh or marinated loin without alterations. In previous studies (Nam *et al.*, 2001), the irradiated meats showed higher amounts of COPs which is opposite to the results found in the present study, but it can be due to the fat that the doses were higher (4.5 KGy).

4. CONCLUSIONS

A study of the effect of E-beam irradiation and packaging on COPs from fresh and marinated pork loin was carried out. An inhibitory effect in the formation of COPs was observed when a marinade was used. The amount and composition of cholesterol oxidation products in fresh loin varied depending on storage temperature, packaging atmosphere and storage time. However, minor changes were observed in marinated loin with storage time alone. Irradiation (below 2 KGy) did not have any effect on COP composition.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Prof. J.A. Ordoñez for his help and advising. This study was supported by projects P08-AGR-03498, AGL-2007-65235-C02-02 and CSD 2007-00016 of the program CONSOLIDER INGENIO 2010.

REFERENCES

Ahn DU, Olson DG, Jo C, Chen X, Wu C, Lee JJ. 1998. Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production, and color in raw pork patties. *Meat Sci.* **49**, 27–39. [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00101-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00101-0).

Anónimo. 2000. USDA approves red meat irradiation. *Meat Processing* March/April, p. 11.

Derezińska D, Obiedziński M. 2010. Cholesterol oxides content in selected animal products determined by GC-MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 1130–1137. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200900238>

Dionisi F, Golay PA, Aeschlimann JM, Fay LB. 1998. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: Methods comparison and validation. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2227–2233. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9710600>.

Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOST). 2004. Guía de mejores Técnicas Disponibles (MTDs) del sector porcino. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), Unión europea, Fondo Estructural.

García-Márquez I, Narváez-Rivas M, Gallardo E, Cabeza CM, León-Camacho M. 2013a. Changes in the phospholipid fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage. *Grasas Aceites* **64**, 7–14. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.084312>.

García-Márquez I, Narváez-Rivas M, Gallardo E, Cabeza CM, León-Camacho M. 2013b. Changes in the volatile compounds of pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage. *Grasas Aceites* **64**, 250–263. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.131412>.

Guardiola F, Codony R, Addis PB, Refecas M, Boatella J. 1996. Biological effects of oxysterols: Current status. *Food Chem. Toxicol.* **2**, 193–211. [http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00094-1](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(95)00094-1).

Guía de mejores Técnicas Disponibles (MTDs) del sector porcino. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), Unión europea, Fondo Estructural. 2006.

Hennig B, Boissonneault GA. 1987. Cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol decrease barrier function of cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis* **68**, 255–261. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150\(87\)90205-X](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150(87)90205-X).

Hwang KT, Maerker G. 1993. Quantitation of Cholesterol Oxidation Products in Unirradiated and Irradiated Meats Eastern Regional Research Center, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, no. 4. U.S. Department of Agriculture, ARS, Philadelphia, Pennsylvania. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02552709>.

IFT. 1999. Facts on food irradiation featured by the IFT New York Section. *Food Technol.* **53**, 94–95.

Janoszcza B. 2010. 7-Ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol in pork meat and its gravy thermally treated without additives and in the presence of onion and garlic. *Meat Sci.* **86**, 976–984. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.08.003>.

Kubow S. 1990. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends Food Sci. Technol.* **1**, 67–74. [http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244\(90\)90049-5](http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244(90)90049-5).

- Lebovics VK, Gaal O, Somogyi L, Farkas J. 1992. Cholesterol oxides in γ -irradiated spray-dried egg powder. *J. Sci. Food Agric.* **60**, 251–254. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740600214>.
- Lee HW, Chien JT, Chen BH. 2008. Inhibition of cholesterol oxidation in marinated foods as affected by antioxidants during heating. *Food Chem.* **108**, 234–244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.072>.
- Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. 2002. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nut. Biochem.* **13**, 700–710. [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00222-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00222-X).
- Lund E, Bjorkhem I. 1994. Down-regulation of hepatic HMGCoA reductase in mice by dietary cholesterol: importance of the 5 double bond and evidence that oxidation at C-3, C-5, C-6 or C-7 is not involved. *Biochem.* **33**, 291–297. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00167a038>.
- Nam KC, Du M, Jo C, Ahn DU. 2001. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. *Meat Sci.* **58**, 431–435. [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00046-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00046-8).
- Narváez-Rivas M, Pham AJ, Schilling MW, León-Camacho M. 2014. A new SPE/GC-fid method for the determination of cholesterol oxidation products. Application to subcutaneous fat from Iberian dry-cured ham. *Talanta* **122**, 58–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.040>.
- Paniangvait P, King AJ, Jones AD, German BG. 1995. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* **60**, 1159–1174. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04548.x>.
- Park SW, Addis PB. 1985. HPLC Determination of C-7 Oxidized Cholesterol Derivatives in Foods. *J. Food Sci.* **50**, 1437–1441. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10494.x>.
- Penazzi G, Carboni MF, Zunin P, Evangelisti F, Tiscornia R, Gallina Toschi T, Lercker G. 1995. Routine high-performance chromatographic determination of free 7-keto-cholesterol in some foods by two different analytical methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**, 1523–1527. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02577847>.
- Peng SK, Taylor CB, Hill JC, Morin RJ. 1985. Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. *Atherosclerosis* **54**, 121–133. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150\(85\)90172-8](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150(85)90172-8).
- Savage GP, Dutta PC, Rodríguez-Estrada MT. 2002. Cholesterol oxides: their occurrence and methods to prevent their generation in foods. *J. Clin. Nut.* **11**, 72–78.
- Sevanian A, Peterson AR. 1986. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 1103–1109. [http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90295-4](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(86)90295-4).
- Smith LL. 1980. The Autoxidation of Cholesterol, in Simic MG and Karel M (Eds.) *Autoxidation in Food and Biological Systems*, Plenum Press, New York and London, pp. 119–132. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-9351-2_7.
- Ubhayasekera SJKA. 2009. Sterols and Oxysterols: occurrence and analysis in by-product feed fats and animal tissues. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Ubhayasekera SJKA, Verleyen T, Dutta PC. 2004. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Evaluation of GC and GC–MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chem.* **84**, 149–157. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00259-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00259-0).

5 DISCUSIÓN INTEGRADORA

5.1 Antecedentes

Debido sin duda al cambio en las actividades laborales y sociales de los países desarrollados, se ha producido una profunda transformación de las costumbres alimentarias en los últimos lustros (puesta de manifiesto sobre todo en las grandes ciudades), lo que ha conducido a que cada vez sea más frecuente el consumo de comidas preparadas tanto en el hogar como fuera de él. Estos acontecimientos han provocado que la industria alimentaria suministre alimentos a la población de una forma muy distinta a la tradicional y que propongan nuevos términos para los alimentos producidos con esta orientación. En este contexto, en los países sajones surgió la denominación genérica *convenience foods*, que ha sido traducido al castellano de diversas formas: comidas rápidas, alimentos preparados, productos de alimentación fácil y alimentos de IV y V gama. Son, en esencia, alimentos preprocesados, precocinados y cocinados en los que se incluyen todos aquellos que tienen un tamaño adecuado para consumo individual, familiar o en raciones destinadas a colectivos, como colegios, industrias, grupos de viajeros, etc. Alternativamente, se les puede agrupar en distintas categorías bajo las denominaciones de alimentos listos para: cocinar (p. ej. hamburguesas refrigeradas o congeladas, gambas rebozadas congeladas), servir (una diversidad de productos que se distribuyen a colectividades, en banquetes, líneas aéreas, colegios, hospitales, etc.), calentar (p. ej., almejas *sousvide*, paella envasada, sopas diversas) y consumir (p. ej., lonchas de jamón cocido o serrano, lonchas de diversos pescados ahumados, zumos, lechuga troceada). Todos ellos se preparan a partir de materias primas (p. ej. zumo de naranja, lechuga troceada, hamburguesas, tartar) o de productos sometidos previamente a un proceso tecnológico de conservación o transformación (p. ej. lonchas de jamón cocido o serrano, embutidos, salmón ahumado). Salvo excepciones, estos alimentos tienen en común que normalmente son raciones pequeñas o, al menos, manejables y envasadas en material plástico de baja permeabilidad. Unos se cocinan antes (paella) o después (productos *sousvide*) de su envasado; algunos se comercializan envasados en crudo para su cocinado (horno, fritura, cocción) inmediatamente antes del consumo (por ejemplo, hamburguesas) y otros, ya procesados (quesos, jamones, pescados), se preparan en industrias, supermercados u obradores mediante simple reducción de tamaño (lonchas y trozos/piezas de varios productos) y se envasan en raciones domésticas para su exposición en las vitrinas de los establecimientos de venta. Estos últimos son productos listos para su consumo RTE.

Los avances en la Ingeniería Industrial y Química, junto al desarrollo vertiginoso de la Informática y la Robótica, han conducido a la automatización de muchas operaciones tecnológicas utilizadas en la elaboración de alimentos de forma que es posible diseñar, a partir de las materias primas convencionales, un producto nuevo con las características que se deseen. Sin embargo, lo que todavía no se ha podido lograr, y difícilmente se conseguirá, es producir alimentos asépticos, debido a que *per se* contienen una carga microbiana definida ya presente en los seres vivos de donde proceden (p. ej. frutas o carnes crudas). Adicionalmente, tampoco se puede evitar, durante la elaboración de un determinado producto, su contacto con nuevos microorganismos procedentes del entorno, manipuladores, utensilios, equipos o de otros alimentos almacenados en las mismas cámaras de las industrias y establecimientos. Todas estas circunstancias hacen que, por una parte, la contaminación por microorganismos alterantes no se pueda evitar y, por otra, exista el riesgo de que, accidental o fortuitamente, algún microorganismo patógeno pueda alcanzar el alimento y se vea comprometida la salud del consumidor. Es necesario pues, controlar las contaminaciones.

Asumiendo que todos los productos preprocesados, precocinados y cocinados se elaboran siguiendo estrictas normas higiénicas, no todos van a tener la misma vida útil ni la misma posibilidad de contener algún microorganismo patógeno, ni de que éste pueda multiplicarse, o no, durante el almacenamiento del mismo. Todas las operaciones que se precisan para su preparación (troceado, loncheado, dosificación o envasado) incrementan los riesgos de contaminación por microorganismos alterantes y, potencialmente, algún patógeno. De hecho, se ha observado que lonchas de derivados cárnicos (p. ej. jamón cocido o bacón) tenían una incidencia mayor de *L. monocytogenes* que antes del loncheado (Zhu y col., 2005b) lo que indica que se ha contaminado durante esta operación o la de reenvasado. Dentro de los grupos de alimentos anteriormente mencionados, la contaminación alcanza mayor relevancia en los RTE debido a que se consumen directamente después de su elaboración, sin que haya una fase intermedia bactericida.

Los alimentos RTE facilitan el consumo, contribuyen, quizás, a disminuir el gasto familiar, ofrecen una calidad sensorial estable, ahorran tiempo a las personas que los utilizan, agilizan el trabajo en el hogar y es probable que tengan otras ventajas. Sin embargo, su elaboración ha creado problemas de diversa índole. Quizás, el más destacado es el de la seguridad microbiológica debido a la transcendencia que tiene en la salud de los

consumidores. Este hecho fue uno de los pilares en que se basó la solicitud del proyecto CARNISENUSA que ampliamente se ha tratado en el capítulo 2 (JUSTIFICACION) y en el que se argumenta la presente investigación. En ella se aborda un doble objetivo: uno comercial y otro sanitario. El primero dirigido a la ampliación de la vida útil de las piezas nobles de la canal porcina, específicamente el lomo, intentando, al tiempo, los menores cambios posibles sensoriales y texturales. El segundo, de carácter sanitario, encaminado a eliminar el microorganismo patógeno de mayor relevancia, *L. monocytogenes*. Debido a la severa patogenicidad y al carácter psicrotrofo de este microorganismo, los reglamentos sanitarios de la mayoría de los países le adjudican una inflexible “tolerancia cero” y su presencia se puede poner de manifiesto mediante un simple enriquecimiento, llevando a la retirada del producto contaminado, por baja que sea la tasa del patógeno. Es cierto que el lomo fresco o adobado va a consumirse tras sufrir un calentamiento durante su cocinado que, al tiempo, destruirá los microorganismos vegetativos, incluidos los patógenos pero, no es menos cierto, que si está contaminado puede convertirse en una fuente de diseminación del microorganismo. Su presencia en el lomo fresco o adobado puede ser la causa de una contaminación cruzada en las industrias procesadoras, contenedores de los vehículos de transporte, salas refrigeradas de almacenamiento de cocinas de restaurantes, instalaciones colectivas e incluso en las del hogar o, al pasar al agua de lavado, contaminar superficies de recipientes y utensilios con que contacta, manos de manipuladores, etc., llegando así a otros alimentos. La presencia potencial de *L. monocytogenes* no sólo adquiere importancia por las contaminaciones cruzadas que puedan ocurrir sino que también tiene un interés comercial. No cabe duda que países con el criterio de tolerancia cero (p. ej. la regulación del USDA de EEUU) no permiten la presencia de esta bacteria en 25 g de producto en ningún momento, pero los criterios microbiológicos menos rigurosos, como el de UE, establecen de forma general una población máxima en el alimento de 100 ufc/g durante su vida útil (EC 1441/2007) para individuos normales (se excluyen lactantes y alimentos destinados a usos médicos especiales) aunque tampoco tienen mucha más tolerancia en relación con la contaminación por *L. monocytogenes* ya que las regulaciones conceden un estrecho intervalo de tiempo (automático de 5 días) para la distribución de aquellos alimentos que pueden permitir el crecimiento de *L. monocytogenes* (entre ellos las carnes frescas incluido el lomo de cerdo) si el fabricante no puede demostrar que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. En cambio, se le aplica el criterio de 100 ufc/g durante su vida útil si puede demostrarlo. En conclusión puede decirse que en los productos en los que puede crecer *L. monocytogenes* que tengan una vida útil superior a 5

días, el criterio es de tolerancia cero salvo que se aplique un tratamiento para eliminar esta bacteria o controlar su crecimiento. Los argumentos anteriores permiten concluir que, por razones tecnológicas (ampliación de la vida útil) y sanitarias (eliminación de patógenos con especial atención a *L. monocytogenes*), urge aplicar un procedimiento que logre ambos objetivos.

L. monocytogenes se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza. Cualquier alimento fresco de origen animal o vegetal puede contener *L. monocytogenes* en diversos niveles (Jay y col., 2005). Así lo ha entendido también la AESAN que, después de analizar la distribución y resistencia a distintos agentes disgenésicos, concluyó que: "...es casi imposible conseguir un alimento fresco libre de *L. monocytogenes*" (AESAN, 2005b). En el caso particular de la carne fresca se ha informado, por ejemplo, que en el Reino Unido el 60% de la carne de pollo vendida al detalle contenía *L. monocytogenes* (Pini y Gilbert, 1988; Petran y Swanson, 1993) y en Irlanda se ha detectado *Listeria* spp. en el 97% de las más de un centenar de hamburguesas congeladas que se analizaron (Sheridan y col., 1994). Porcentajes menores se han observado en carne de vacuno fresca en Holanda y EEUU, ya que se han publicado porcentajes del 7,5% de muestras positivas a *L. monocytogenes* de 417 analizadas y del 7,1% de 1.727, respectivamente (Green, 1990). En un extenso estudio realizado en Portugal (Menaar y col., 2004) sobre la incidencia de *L. monocytogenes* en diferentes alimentos comercializados en ese país, se encontraron los siguientes porcentajes de *L. monocytogenes*: 60% en carne de pollo fresca, 17,7% en carnes rojas de vacuno, 25% en jamón, 2,3% en jamón curado y 3,7% en salchichas al estilo español. Los datos de España muestran también una elevada presencia de esta bacteria en carnes frescas; por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en Navarra, durante un período de 4 años, se informó que el 39,9% de la carne picada de cerdo o vacuno (sobre 295 muestras analizadas) y el 36,1% de la de pollo (158 analizadas) contenían *L. monocytogenes* (Vitas y col., 2004). Recientemente, se ha publicado un estudio (Popovic y col., 2014) sobre la incidencia de *L. monocytogenes* en Australia durante el periodo 2001 - 2010, concluyéndose que *ready-to-eat foods are high-risk vehicles for transmitting listeriosis*, indicándose también que el 51% de los decomisos se debió a *L. monocytogenes* y de éstos, el 64% correspondió a productos cárnicos RTE.

Aunque la incidencia de *L. monocytogenes* en los alimentos en general, y en la carne y productos cárnicos en particular, sea elevada, los niveles que se han descrito normalmente

no superan el valor de 100 ufc/g (Córdoba, 2011) e incluso pueden ser menores a esa cifra (Green, 1990; Jay y col., 2005). Quizás, basándose en esta baja carga, y en que se considera que la dosis infectiva para que se produzca listeriosis es elevada (Notermans y col., 1998; SCVPH, 1999) en individuos normales, se estableció el límite de 100 ufc/g en la regulación europea, aconsejado también por la ICMSF (2002), lo que viene apoyado además por el hecho de que una mayor intolerancia, como la de ausencia en 25 g, no proporciona un nivel más elevado de protección (Ross y col., 2000).

Por otra parte, a partir de los datos tabulados por la FDA (2003) que proceden, a su vez, de diversos autores, puede deducirse que el aumento del número de listerias a 4 °C en productos cárnicos es de alrededor de 0,2 unidades logarítmicas por día. Lo mismo se deduce de la regulación de la UE (CE 1441/2007), por la que se concede un período automático de 5 días para comercializar productos que pueden favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*, ya que subyace que la carga original de células de esta bacteria que el producto puede tener es del orden de 10 ufc/g en concordancia con lo que estima la ICMSF (2007) en relación con una contaminación potencial durante las manipulaciones del procesado de un producto. Superada la vida útil de 5 días en un determinado producto, el criterio microbiológico europeo respecto a *L. monocytogenes* es también el de “tolerancia cero” (véanse párrafos anteriores). En definitiva, puede deducirse que sólo para el comercio local o para zonas geográficas cercanas (por ejemplo, duración del transporte unas 12-24 h como máximo), pero no a largas distancias, puede distribuirse, desde el punto de vista sanitario, un alimento que permita el crecimiento de *L. monocytogenes*.

El comercio actual de alimentos, incluidos los frescos, además de hacerse a cortas distancias, es muy normal que su destino sea más lejano, incluso el de los más perecederos, como la leche cruda refrigerada que, procedente de las zonas de producción, se transporta mediante camiones isoterms o refrigerados hasta centrales distantes, por ejemplo del norte al sur de España o entre países de la UE. Pueden hacerse las mismas consideraciones para la carne fresca, con la diferencia de que es habitual que este producto, sin otro tratamiento que el de refrigeración, se exponga en las vitrinas de venta al detalle en hipermercados, supermercados u otras expendedurías de alimentos o, alternativamente, puede que su destino sea una industria cárnica para proceder a su transformación. A modo de ejemplo, se pueden citar las canales o piezas cárnicas de cerdo cuyo comercio, sin restricción alguna, es muy normal entre los países europeos. Este comercio requiere un mayor tiempo de

distribución de la mercancía que, unido al almacenamiento en la plaza de destino, puede superar los cinco días críticos establecidos en la regulación microbiológica de la UE para su comercialización inmediata. Estas circunstancias, y probablemente otras no mencionadas, permiten deducir la necesidad que hay de aumentar la vida útil de la carne fresca. La Tecnología de Alimentos dispone de métodos eficaces (congelación, esterilización, deshidratación, etc.) para conservar los alimentos durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, los consumidores de los países desarrollados demandan, cada vez más, el suministro de alimentos mínimamente procesados, "sanos", "frescos" y "naturales", sin la adición de "conservantes" y con una vida útil suficientemente amplia para poderlos consumir en un tiempo lo más largo posible. No es de extrañar, por tanto, que se hayan investigado métodos para prolongar la vida útil de la carne fresca. Entre estos métodos está el uso de atmósferas modificadas, incluido en este término el envasado a vacío, que pretenden, en esencia, cambiar el entorno gaseoso del alimento, creando una nueva mezcla de gases que inhiba o detenga el progreso de los agentes alterantes. En el caso de la carne fresca se utiliza habitualmente una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono (normalmente 20-30%), con el fin de inhibir a la microbiota aeróbica Gram negativa, y oxígeno (80-70%) para retener el color rojo brillante de la mioglobina oxigenada, aunque a veces estas concentraciones pueden variar y mezclarse con nitrógeno como gas de balance (Ordóñez y Ledward, 1977; Asensio y col., 1988; McMillin, 2008; Singh y col., 2011). Es un procedimiento muy utilizado pero la ampliación de la vida útil que puede lograrse, como máximo, una duplicación del tiempo de comercialización en el caso de la carne de cerdo (Asensio y col., 1988). Sin embargo, en los tiempos que corren, ese tiempo de almacén se ha quedado corto, debido al incremento que ha sufrido el comercio por todo el globo, donde las distancias son tremendamente largas, como entre Norteamérica, Latinoamérica y Europa y, aún más, entre los países asiáticos y Europa. A estas circunstancias se unen las economías emergentes de algunos países de aquella zona geográfica (p. ej. China o Corea) y otros latinoamericanos (como Brasil) que gozan de una prosperidad creciente. Cuando el destino de la mercancía alcanza las dimensiones mencionadas, no es posible transportar y distribuir la carne en refrigeración en unos pocos días a no ser por el uso de la vía aérea pero este sistema encarece notablemente el producto. En la actualidad, se hace mediante transporte marítimo bajo congelación pero los consumidores de aquellos países, cada vez con un poder adquisitivo mayor, demandan, al igual que los de los países occidentales, alimentos frescos, naturales, saludables y variados.

Los tratamientos tecnológicos de conservación de alimentos están destinados a garantizar la puesta en el mercado de un producto microbiológicamente seguro y con una vida útil adecuada en relación con el uso que se espera del mismo. Por lo tanto, es necesario asegurar el control del peligro y resolver el problema tecnológico de la vida útil. Obviamente, es necesario aplicar un tratamiento que logre estos dos objetivos y, al tiempo, satisfaga las expectativas de los consumidores.

Las tecnologías que se usan actualmente para los requerimientos de la globalización del comercio y exigencias de la calidad sensorial y sanitaria de la carne fresca no satisfacen completamente las premisas mencionadas. Es cierto que se ha minimizado notablemente la contaminación de la carne, lo que se ha debido, por una parte, a la presión de las autoridades sanitarias para aplicar en la producción de alimentos las más estrictas medidas higiénicas, muchas de ellas basadas en los programas APPCC y, por otra, a la automatización de las operaciones en las industrias alimentarias. Como muestra de la aplicación de programas de esta naturaleza, se puede citar un estudio realizado desde 1992 a 1995 en mataderos belgas y franceses destinado a conocer la evolución de la incidencia de *L. monocytogenes*. En productos avícolas, siempre que se detectó la bacteria fue a niveles bajos (>1 ufc en 100 cm^2 o 25 g) aunque la incidencia fue reduciéndose en ese periodo desde el 32,1% en 1992 y 27,2% en 1993 hasta el 3,6% y 2,1% en 1994 y 1995, respectivamente (Uyttendaele y col., 1997). Sin embargo, no es menos cierto que aunque la calidad microbiológica inicial de la carne haya mejorado, no por ello puede ampliarse la vida de almacén hasta niveles que cumplan, en el punto de destino los estándares de calidad microbiológica exigidos en el comercio internacional. Se precisa aplicar tecnologías suficientemente eficaces para tales requerimientos y que permitan mantener al máximo las características del producto fresco. La Tecnología de Alimentos ha de ocuparse de ello. Entre ellas, se dispone de una tecnología bien conocida que se desarrolló en las primeras décadas de la segunda mitad del siglo pasado. Se trata de las radiaciones ionizantes, la que, tradicionalmente, se ha considerado como una tecnología de último recurso, quedando relegada para utilizarse solamente cuando todo lo demás fallaba o después de no encontrar otra solución a los problemas específicos del procesado de alimentos. La que suscribe asume la opinión de la AESAN y hace suyas las palabras de esta agencia: “aparentemente, este tiempo ha llegado” (AESAN, 2005b).

La petición de la industria de la necesidad de ampliar la vida útil del lomo fresco de cerdo, por una parte, y los antecedentes mencionados, por otra, llevó a la autora de esta memoria, en concordancia con el supervisor del subproyecto PROCARTE del proyecto CARNISENUSA y el coordinador general de CARNISENUSA (véase en el capítulo 2, JUSTIFICACIÓN), a concluir que urgía el desarrollo de un método que permitiera ampliar la vida útil, tanto del lomo fresco de cerdo como del adobado, con el objetivo de ofrecer a la industria una posibilidad para enviar piezas de carne fresca refrigerada a distancias mayores que lo que las tecnologías utilizadas en la actualidad permiten. Adicionalmente, se consideró que sería conveniente que el método que se desarrollase inhibiera el crecimiento de la microbiota alterante y garantizara la ausencia de microorganismos patógenos vía alimentaria.

Ante la imposibilidad de aplicar tratamientos térmicos y la conveniencia de sustituir a la congelación, la autora, en un intento de resolver el problema, se fijó en las radiaciones ionizantes, debido a la extensa documentación que existe en la bibliografía universal acerca de su eficacia bactericida (FAO/IAEA/WHO, 1981; WHO, 1994; FDA, 1999; AESA, 2005b; EFSA, 2011a y b; AESAN, 2013). Dentro de esta tecnología se eligió la modalidad de electrones acelerados por ser una tecnología “limpia”, que opera en flujo continuo y es fácil de utilizar (de la Hoz y col., 2011). Decidió, pues, acometer los experimentos oportunos para conocer la eficacia del tratamiento con electrones acelerados (*ionización electrónica*) en la reducción de la carga de la microbiota presente en la materia prima y la respuesta de *L. monocytogenes* frente a la acción letal de los mismos. Al tiempo, tuvo que estudiar el comportamiento de las propiedades reológicas y sensoriales de la carne tratada para analizar el efecto de esa tecnología en las propiedades que caracterizan a este alimento. Adicionalmente, se hizo un estudio sobre la integridad de la fracción lipídica y los volátiles generados durante el tratamiento ionizante.

El desarrollo de la investigación y los resultados obtenidos se recogen de forma detallada en el capítulo 4 de la presente memoria. Aunque la transcendencia práctica se analiza también en las publicaciones incluidas en esa sección, falta, quizás, una serie de aspectos generales que no se han podido incluir en los resultados, debido a las instrucciones de las editoriales que han publicado los artículos, siempre exigentes con la brevedad de resultados, reclamando reflejarlos solamente de forma concisa.

5.2 Aspectos tecnológicos (ampliación de la vida útil)

En la introducción se ha recogido brevemente la información disponible acerca de la aptitud de las radiaciones ionizantes para ampliar la vida útil de la carne y algunos productos cárnicos, que en definitiva es sinónimo de eficacia bactericida sobre la microbiota alterante, en particular la no esporulada. En este capítulo, pues, sólo se mencionará algún concepto o argumento cuando la discusión lo requiera.

5.2.1 Oportunidad de la investigación

En primer lugar, quizás convenga exponer la oportunidad de la investigación que se refleja en esta memoria. Para ello, se ha seleccionado el destino más desfavorable, el Lejano Oriente. A modo de ejemplo, se han recogido en la tabla 5.1 los datos procedentes de las estadísticas españolas de comercio exterior (ICEX, 2015) del Ministerio de Economía y Competitividad sobre las exportaciones de carne fresca de la especie porcina a tres países (Corea del Sur, Japón y China) de aquella zona terrestre. Además, se exportan cantidades más pequeñas (inferiores a 5.000 Tm) a otros países de la misma zona geográfica, como Filipinas o Malasia. Salvo remesas puntuales vía aérea, la mercancía se envía bajo congelación por transporte marítimo.

Tabla 5.1 Exportaciones de carne de cerdo a Corea del Sur, Japón y China

Carne de la especie porcina (Tm) expotada a China, Japón y Corea del Sur durante el periodo de 2011 a 2014					
	2011	2012	2013	2014	Variación 2011-14
China	44.550,77	50.723,35	55.388,73	74.815,00	68%
Japón	25.356,65	26.390,58	34.469,99	68.408,19	170%
Corea del Sur	23.709,71	17.039,62	13.673,21	42.551,84	79%

En 2014 se exportaron un total 185.775 Tm de carne cruda de cerdo de diversas razas a los tres países orientales, lo que no es nada desdeñable, y es de suponer que el comercio vaya en aumento. No obstante, puede observarse en la tabla 5.1, los incrementos son espectaculares, en especial el de Japón que supuso un 170% durante el período 2011-2014. Dada la preferencia de los consumidores por la carne refrigerada respecto a la congelada, los datos anteriores permiten inferir que si el material, la carne cruda, se mantuviese bajo refrigeración se impulsaría el comercio a grandes distancias. La exportación de carne de cerdo se ha ejemplarizado con las expediciones a grandes distancias que refleja la situación

más desfavorable pero hay que tener en cuenta que el volumen de producto destinado al mercado europeo es, lógicamente, de mayor magnitud. Por tanto, el impulso del comercio al que se ha hecho referencia en el párrafo anterior constituye un desafío para la Tecnología de Alimentos en relación con el desarrollo de un método para satisfacer la demanda de esos mercados tan distantes y, por supuesto, otros más cercanos, como son los de los países europeos y latinoamericanos.

5.2.2 Consideraciones relativas al lomo fresco (Effect of E-beam on the shelf-life extension and safety of whole fresh pork loin)

La alteración de la carne almacenada en refrigeración es un fenómeno superficial que se debe al crecimiento de la microbiota aerobia Gram negativa (Gill y Newton, 1977; Dainty y col., 1983), fundamentalmente diversas especies del género *Pseudomonas* (Dainty y col., 1983) debido a que son las que presentan el tiempo de duplicación más bajo a las temperaturas habituales de refrigeración de la carne, con valores del nivel de 7-10 h frente a las 12-14 h de otras bacterias psicrotrofas (Snyder, 1996). No obstante, tampoco puede desecharse la participación de bacterias de otros géneros también con la facultad de multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Diversas investigaciones permiten concluir que, asumiendo que se guardan estrictas normas higiénicas durante su preparación, la vida útil de las piezas (solomillo, lomo, babilla, etc.) de carne de cerdo refrigerada no va más allá de una semana a 4 °C (Gill y Newton, 1977; Dainty y col., 1983; García-Márquez y col., 2012a), suponiendo una carga original de microorganismos viables del orden de 10^4 ufc/cm², que se considera un producto de una buena calidad microbiológica (Edwards y col., 1987). Este valor fue justamente del que se partió en las investigaciones que se reflejan en la presente memoria (véase figura 1 del artículo I).

El tratamiento de ionización electrónica ocasionó 2,0 y 3,6 reducciones decimales cuando se aplicaron 1 y 2 kGy, respectivamente, lo que implica que la tasa original se redujo hasta niveles más bajos que los habituales y, en principio, ya se podía prever un aumento de la vida útil, dado que la carga inicial es uno de los parámetros que influye en el tiempo en que se manifiesta la alteración (Ayres, 1960a). La previsión se iba confirmando a medida que avanzaba el periodo de almacenamiento. Al transcurrir 6 días de almacenamiento se observó que las muestras controles ya estaban alteradas (o su alteración era inminente), ya que el recuento total alcanzó el valor de 5×10^7 ufc/cm² mientras que los de las muestras ionizadas permanecía todavía a niveles relativamente bajos ($<10^6$ ufc/cm²)

cuando se aplicó la dosis más baja y aún más en las muestras tratadas con 2 kGy. Incluso cuando el almacenamiento se realizó a 8 °C, la microbiota total mostró niveles admisibles en ese período. Además de ser la carga de viables en las muestras tratadas más baja que en los controles, no se detectaron pseudomonas, lo que se debió, sin duda, a la sensibilidad de estas bacterias frente a las radiaciones ionizantes (Maxcy y Tawari, 1973; Patterson, 1988). A estos efectos se une un crecimiento más lento de la microbiota superviviente al tener que reparar las lesiones ocasionadas por el tratamiento con electrones acelerados (Cabeza y col., 2010). De hecho, se calculó un valor g de 14,8 h en las muestras irradiadas frente a 10,3 h en las no tratadas. A 4 °C la aplicación de 1 kGy ocasionó un aumento de la vida útil, desde los 5 días de las muestras control hasta los 11 días de las tratadas, lo que supuso su duplicación. Puede concluirse que este incremento se debe al efecto letal de la radiación que conlleva un descenso de la velocidad de crecimiento de los microorganismos supervivientes.

Cuando el tratamiento fue de 2 kGy se logró un aumento mayor de la vida útil, estimándose en 18-20 días. Cabe destacar que apenas se alcanzó el nivel crítico de 5×10^7 ufc/cm², se observó una estabilización de la carga microbiana, manteniéndose ligeramente por debajo durante un cierto tiempo. De ahí, que el periodo de almacenamiento se multiplicara por un factor de algo más de 3 (de 6 hasta al menos 20 días), estimándose un valor g de unas 19 h.

Durante el transporte de la carne fresca bajo refrigeración, no es raro, desgraciadamente, que se observen fluctuaciones de la temperatura de almacenamiento, lo que se ha venido en denominar un “abuso” de temperatura. Este hecho, no cabe duda, preocupa porque va en detrimento de la vida útil. No obstante, la solución de continuidad de la cadena del frío habitualmente es ocasional. Es cierto, como en este trabajo se ha probado, que la vida útil del lomo fresco a 8 °C fue menor; por ejemplo, con un tratamiento de 1 kGy pasó de unos 12 días a 4 °C a unos 9 días a la temperatura de 8 °C, es decir, se redujo en un 25%. No obstante, hay que tener en cuenta que la temperatura se mantuvo a 8 °C durante el periodo completo de almacenamiento, lo que en la práctica normalmente no va a suceder, ya que es de esperar que el abuso de temperatura se produzca durante cortos periodos retornando a su valor inicial de la cámara/bodega frigorífica, lo que puede traducirse en una disminución de la vida útil en un porcentaje inferior al especificado anteriormente. Por otro lado, la aplicación de 2 kGy ocasionó un notable aumento de la

vida útil en muestras mantenidas a 8 °C, del orden de dos semanas, lo que demuestra, una vez más, el gran valor tecnológico del tratamiento con electrones acelerados como proceso de conservación de alimentos, en este caso la carne fresca.

Los ensayos reológicos permitieron estudiar el comportamiento de una serie de propiedades (fuerza de ruptura, dureza, adhesividad, cohesividad, elasticidad y masticabilidad) frente al tratamiento con electrones acelerados. En general, puede decirse que el tratamiento de ionización no tuvo un efecto manifiesto en las características de la textura de la carne. No obstante, en el análisis estadístico, se detectaron diferencias ($p < 0,05$) en la cohesividad y masticabilidad de las muestras tratadas con 1 ó 2 kGy y el producto control. Estos cambios, aunque matemáticamente significativos, no tuvieron una intensidad suficiente como para ser detectados por el consumidor, especialmente si no se cuenta con un patrón de referencia para comparar, dado que los valores de estos parámetros de textura estuvieron en el intervalo de los que habitualmente se han ofrecido para la carne. Se está hablando de los valores siguientes: cohesividad ($\times 10^{-2}$ m) de $0,50 \pm 0,03$ ab; $0,45 \pm 0,04$ b y $0,51 \pm 0,04$ a para las muestras no tratadas (controles) y las sometidas a 1 y 2 kGy, respectivamente. Para la masticabilidad los valores hallados fueron: $0,029 \pm 0,005$ a; $0,021 \pm 0,005$ b y $0,023 \pm 0,005$ ab, a las dosis anteriores. Como se ha indicado, son diferencias mínimas y puede concluirse, en términos generales, que al menos a dosis de hasta 2 kGy no se producen cambios substanciales en las propiedades reológicas de la carne. Este resultado está en línea con las apreciaciones de que es necesario una dosis de 6 kGy para observar alguna diferencia en la textura de carne de cerdo fresca (Lacroix y col., 2002) y superiores a 10 kGy para lograr una fragmentación de las miofibrillas y reducir la capacidad extensible del músculo (Segars y col., 1981; Lambert y col., 1992).

Sin embargo, el comportamiento reológico de la carne, con excepción de la cohesividad y de la fuerza de rotura, se vio afectado por el almacenamiento (el tiempo y/o la temperatura). Se ha observado un incremento de la adhesividad a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. No obstante, este efecto no se atribuyó al tratamiento ionizante sino al crecimiento de las bacterias Gram negativas, ya que los incrementos fueron mayores en las muestras no tratadas, justamente donde, como es sabido, la microbiota se multiplicó a temperaturas de refrigeración, alcanzando valores superiores a 10^8 ufc/cm² a los que se manifiesta la limosidad superficial (Gill y Newton, 1977; Dainty y col., 1983), que es precisamente a lo que se asignó el incremento de los valores de adhesividad. La

elasticidad también se modificó durante el almacenamiento, pero los cambios producidos dependieron de la temperatura a la que se mantuvieron las muestras (como se refleja en la significativa interacción tiempo-temperatura), y sólo fueron significativos cuando el almacenamiento se hizo a 8 °C. La temperatura de almacenamiento también afectó a la dureza de la carne, pero este efecto estuvo condicionado por el tiempo y el tratamiento aplicado. Esta interacción (temperatura, tiempo y dosis aplicada), explica que la carne tratada a 2 kGy resultara menos dura a medida que avanzaba el tiempo de almacenamiento a 8 °C, alcanzándose el valor más bajo al final de la vida útil. Estos hechos pueden estar relacionados con la potenciación de las actividades químicas y enzimáticas que acaecen a mayor velocidad a medida que aumenta la temperatura. Este fenómeno no pudo ponerse de manifiesto a 4 °C. Consecuentemente, se puede concluir que el tratamiento con electrones acelerados tuvo un efecto menor en las propiedades reológicas de la carne que el tiempo y temperatura de almacenamiento.

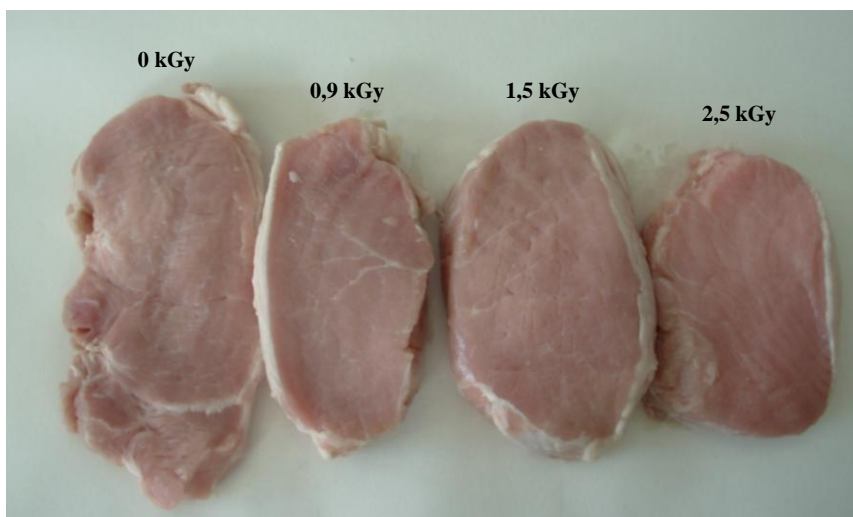
El color es de crucial importancia para la elección de una determinada pieza (o filete) de carne fresca por el consumidor, ya que es el atributo en que primero se fija. Se ha indicado que el tratamiento con radiaciones ionizantes induce cambios en el color de la carne (Nanke y col., 1998; Brewer, 2004), pero también se ha informado (Nam y Ahn, 2003b) que el efecto es más acusado en la carne de vacuno, pudiendo conducir a un color grisáceo-verdoso cuestionable (Kim y col., 2002; Cambero y col., 2013). En cualquier caso, el cambio de color se debe a la versatilidad del átomo de hierro de la mioglobina, un fenómeno muy complejo que, en el caso del tratamiento con radiaciones ionizantes, depende más de la atmósfera (aerobia, vacío, enriquecida en dióxido de carbono o en presencia de monóxido de carbono) en la que se aplica el tratamiento que de la radiación en sí (Ahn y col., 1998; Brewer, 2004). En esta línea, se ha afirmado que la radiación *per se* apenas tiene efecto en el color proporcionado por la mioglobina (Stetzer y col., 2009). De hecho, bajo las mismas condiciones (p. ej. en aerobiosis), se ha observado, unas veces, un incremento del color rojo (Chen y col., 1999), detectado mediante el aumento del valor a^* (tendencia al rojo) y en otras, un descenso del valor de dicho parámetro (Stetzer y col., 2009). Contradicciones similares se han observado en carne envasada a vacío (Brewer, 2004). Puede que tales discrepancias estén estrechamente relacionadas con la actividad de los sistemas reductores enzimáticos y la presencia en el tejido muscular de compuestos reductores (NADH, glutatión) en el momento del tratamiento con radiaciones ionizantes, lo que conlleva una gran complejidad en el momento de evaluar la proporción del pigmento

que está en una u otra forma (Fe^{++} , O_2^- , Fe^{+++}). Cabe añadir, que la tendencia al rojo (valor a^*), además de depender de los factores endógenos citados anteriormente, está influido también por agentes exógenos, como la luz, presión de oxígeno y la contaminación microbiana (Faustmann y Cassens, 1990). En este trabajo, por el mero tratamiento con electrones acelerados, se han observado valores ligeramente más bajos para el parámetro a^* (tendencia al rojo) y más elevados para el de tendencia al amarillo (b^*) y para la luminosidad (L^*) en relación con las muestras no tratadas, lo que está de acuerdo con unos autores (p. ej., Nam y Ahn, 2003b; Stetzer y col., 2009), pero son resultados opuestos a los publicados por otros investigadores (p. ej., Chen y col., 1999). Algunos autores han especulado que los sitios activos de la mioglobina pueden reaccionar con radicales libres (hidroxilos o sulfhidrilos) generados durante el tratamiento ionizante rindiendo metamioglobina (color parduzco) o sulfomioglobina (color rojo), lo que puede justificar también la contradicción entre los resultados de unos y otros autores. En relación con la vida útil, la tonalidad rojiza (parámetro a^*) de la carne descendió con el incremento del tiempo de almacenamiento, tanto en el caso de las muestras tratadas como en las control. En ambos casos, se observó que al retirar el envase, la carne adquiría un color más rojo (aumento el valor a^*), lo que se debió, sin duda, a la reacción del oxígeno del aire con la sexta posición de coordinación del hierro del pigmento. Lógicamente, se observó una tendencia inversa en el parámetro L^* , asociada a la pérdida de exudado y la consiguiente deshidratación de la superficie ante el incremento del tiempo de exposición al aire.

El valor b^* se incrementó con el tiempo de almacenamiento y este hecho se vio potenciado con la exposición de la carne al aire tras la apertura del envase. Esta mayor tendencia al amarillo se relaciona con la liberación de exudado y la pérdida de proteínas sarcoplásmicas, fundamentalmente mioglobina. En todo caso, como se ha mencionado anteriormente, el efecto del tratamiento de ionización en el color de la carne es complejo y dependiente de múltiples factores como han descrito diversos autores (Brewer, 2004). En esta línea, en el presente estudio se observó una interacción de los efectos del tratamiento aplicado, del periodo de almacenamiento y del tiempo de exposición de la carne al aire tras la apertura de los envases que implica que los cambios de color (en concreto de la tendencia al rojo y del brillo) no puedan explicarse de forma aislada, considerando un solo factor. En general, la carne tratada a la dosis más elevada (2 kGy) mostró más brillo y tonalidades más pálidas y amarillentas que se relacionan con la menor CRA y, por consiguiente, la mayor pérdida de exudado. No obstante, aunque analítica y

estadísticamente se encontraron algunas diferencias, no puede decirse que éstas fuesen notorias, de tal modo que cabe concluir que las muestras tratadas a 1 o 2 kGy difícilmente serían diferenciadas por el consumidor, donde se observan considerables variaciones de tonalidades en la carne de lomo que se comercializa. Este hecho se confirmó con el análisis sensorial y como puede claramente observarse en la figura 5.1.

Figura 5.1 Imagen de lomo de cerdo fresco sin tratar (0 kGy) y tras el tratamiento con electrones acelerados a diferentes dosis



Si el color es el atributo que primero observa el consumidor, el olor es, tal vez, el más sensible a la radiación (García-Márquez y col., 2012b). El olor, tras el tratamiento, mostró diferencias significativas detectadas tanto en el análisis triangular como en el de preferencia (prueba de rangos). Es completamente normal, ya que repetidas veces se ha informado que las muestras sometidas a tratamiento ionizante despiden un olor característico "*a irradiado*", que en el caso de los productos proteicos se describe como a "pluma quemada/escaldada" y "caldo de cultivo caliente" (Cabeza y col., 2007), entre otras calificaciones. Por otra parte, también está bien documentado que estos matices olfativos anómalos desaparecen tras un cierto tiempo de almacenamiento. Como era de esperar, las muestras no tratadas alcanzaron la máxima puntuación (60 puntos) cuando se analizaron en las pruebas de rango a la vez que las que recientemente se habían sometido a 1 o 2 kGy (34 y 26, respectivamente). Al quinto día de almacenamiento, se siguieron detectando diferencias significativas pero la puntuación se invirtió, alcanzando la máxima puntuación (51) las tratadas con 1 kGy, seguidas por las sometidas a 2 kGy (37), mientras que los controles fueron clasificados en último lugar con (32); la puntuación de las tratadas fue aumentando con el tiempo de almacenamiento, reflejo de la disipación del olor anómalo

producido por el tratamiento mientras que, en los controles, la puntuación fue disminuyendo. Este paradójico resultado tiene una explicación muy sencilla; procede de la vía útil tan corta de la carne no tratada que, como se ha mencionado anteriormente, fue de 6 días; no es de extrañar, pues, que los miembros del jurado detectaran ya, en el día 5, los olores anómalos derivados del crecimiento microbiano que en ese tiempo de almacenamiento alcanzó un recuento total rayando el nivel de 5×10^7 ufc/cm² mientras que las muestras tratadas con 1 kGy tenían una carga del orden de 10^5 ufc/cm² y las de 2 kGy, por supuesto, todavía más baja y, por ello, no se habían generado volátiles de origen microbiano que alcanzaran el umbral de detección por el olfato. Cabe añadir, que tras el tratamiento culinario no se detectaron cambios sustanciales en el flavor de la carne, tanto después del proceso de irradiación como durante el almacenamiento en refrigeración. Este hecho se ha relacionado con la liberación y pérdida de la mayoría de los compuestos aromáticos que podrían formarse en el tratamiento de irradiación durante el calentamiento de la carne (Lacroix y col., 2002; Du y col., 2002).

El análisis triangular confirmó los resultados del color determinado instrumentalmente, ya que la apariencia de las muestras tratadas fue, inmediatamente después de la aplicación de electrones acelerados, algo más pálida que la observada en los controles, equivalente a la ligera disminución del parámetro a^* . Sin embargo, los miembros del jurado juzgaron unánimemente que las muestras eran aptas para el consumo, con independencia del tiempo de almacenamiento y de la dosis aplicada. La prueba de la suma de rangos coincidió con los datos derivados del análisis triangular y, realmente, las muestras no tratadas alcanzaron una puntuación más elevada, pero a los 5 días de almacenamiento se niveló la diferencia, incluso la puntuación fue ligeramente más alta tanto en las muestras sometidas a 1 kGy (38 vs 36) como en las tratadas con 2 kGy (46 vs 36).

La conclusión final a la que se llegó respecto a la ampliación de la vida útil quedó reflejada en el artículo de la revista *Journal of Food Protection* con las siguientes palabras textuales: “*The results obtained in this study indicate that the shelf life of whole fresh pork loin at 4 °C may be extended from 5 to 11 or 18 to 20 days by the application of 1 or 2 kGy of E-beam radiation, respectively. Likewise, under conditions of moderate temperature abuse (8 °C), the shelf life would be extended from 3 to 8 and 15 days, respectively, by the application of 1 or 2 kGy doses, without compromising the sensory qualities*”.

Se considera que el objetivo que se planteó en la tesis se ha conseguido. De hecho, la ampliación de la vida útil lograda puede permitir el transporte de lomo fresco de cerdo y, por extensión, de otras piezas cárnicas bajo refrigeración a distancias que, de otra forma, difícilmente llegarían a su destino con la calidad sensorial adecuada para su comercialización en el mercado receptor. En este contexto, se estima que el tratamiento de la carne fresca con electrones acelerados puede ser un método adecuado para que, sin que se evidencie signo de alteración, pueda transportarse el producto a distintos mercados europeos (1.500-6.000 km) y americanos (6.000-9.000 km), bien por vía terrestre en los primeros (1-3 días de tránsito en vehículos refrigerados), o por vía marítima (buques refrigerados) en los segundos (con una singladura de 450-500 millas náuticas, o sea, alrededor de 6-9 días).

El objetivo de la investigación era más ambicioso dado que se perseguía averiguar la posibilidad de aumentar la vida útil de la carne fresca con vistas a su exportación en estado refrigerado a zonas geográficas muy lejanas. Con esta finalidad se ha hecho una estimación de una situación límite ejemplarizándose con un potencial envío de la mercancía a las antípodas de Europa. En la tabla 5.1 se han indicado las exportaciones de carne congelada a tres países del Lejano Oriente. Se observa que en los últimos años han sufrido un notable incremento; son mercados emergentes con economías prósperas y, por tanto, conviene atender el comercio con los mismos y abrir otros destinos en el continente asiático. Sin embargo, están excesivamente distantes para proceder, vía marítima, a envíos de carne en estado refrigerado. La distancia que separa a aquellos países de Europa puede estimarse en unos 15.000 (8.100 millas náuticas) - 20.000 km (10.800 millas), lo que un buque refrigerado tardaría en recorrer 18-22 días, suponiendo una singladura de 450-500 millas náuticas. Es un tiempo demasiado largo y, probablemente, la carne tratada con electrones acelerados a dosis de 2 kGy llegaría, si no con signos de alteración incipientes, en un estado muy próximo a que se detectaran.

No obstante, hay alternativas que podrían aplicarse para aumentar aún más la vida útil; una sería aplicar el tratamiento a una dosis más elevada pero con el riesgo de que pudieran detectarse cambios sensoriales, aunque en el análisis sensorial que se realizó en las muestras tratadas con dosis de hasta 2,5 kGy se obtuvieron resultados satisfactorios. Una segunda alternativa sería rebajar la temperatura de almacenamiento hasta, por ejemplo, 2 °C, lo que ocasionaría un aumento del valor *g* de la microbiota psicrófila; en este sentido, se ha

descrito un tiempo de generación de *Pseudomonas* spp. de unas 14 h a 2,5 °C (Snyder, 1996) frente a las 10,3 h que se ha hallado en este trabajo, lo que supondría un crecimiento más lento con el consiguiente aumento de la vida de almacén. Una tercera posibilidad sería aplicar el tratamiento en lomos envasados a vacío. El vacío *per se* ocasionaría una ampliación de la vida útil de forma significativa. Sin embargo, no es fácil establecer la vida útil de la carne envasada a vacío, dado que las BAL son las dominantes (Dainty y col., 1983; De Pablo y col., 1989) y típicamente su número no suele pasar de 10^8 ufc/cm², pudiendo permanecer a esos niveles durante días (Dainty y col., 1979). No obstante, las sustancias odoríferas resultantes del metabolismo de las BAL van acumulándose proporcionando a la carne olores anómalos (De Pablo y col., 1989), aunque no tan “ofensivos” como los generados en la carne en aerobiosis. En cualquier caso, puede estimarse que la vida útil no es inferior a 15 días (De Pablo., 1989). Lógicamente, la ionización electrónica ocasionaría un aumento de la vida útil. En la figura 2 del artículo de García-Márquez y col. (2012b) se expresa el efecto del tratamiento con electrones acelerados (1 y 2 kGy) en la microbiota láctica y su evolución posterior durante el almacenamiento a 4 y 8 °C. El efecto letal del tratamiento ocasionó una reducción del número de BAL hasta niveles de menos de 100 ufc/cm² (con dosis de 1 kGy) o no detectables (con 2 kGy). Después de 20 días de almacenamiento, las muestras sometidas a 2 kGy mostraron una carga de BAL inferior a 10^6 ufc/cm², sin mostrar incremento adicional alguno. Por tanto, la ionización electrónica en muestras envasadas a vacío es una buena alternativa para aumentar, se podría decir casi espectacularmente, la vida útil de la carne de cerdo fresca envasada a vacío.

5.2.3 Consideraciones relativas al lomo adobado (Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin)

El lomo adobado es un elaborado cárnico que se prepara mediante masaje o malaxado en un tambor rotatorio con la incorporación de diversos coadyuvantes y aditivos alimentarios que, en el presente caso, fueron los siguientes en las proporciones (p/p) que se indican: sal (1,5%), nitratos y nitritos (0,025%) en una relación 2/1 (p/p), ácido ascórbico (0,08%) y especias [1,4% de una mezcla de pimienta blanca y pimentón en la proporción 1/6 (p/p)]. Normalmente, se distribuye en piezas enteras a los supermercados pero es muy común venderlo al consumidor en raciones familiares (en porciones o fileteado) envasadas en bolsas o bandejas expuestas en vitrinas refrigeradas.

A diferencia del lomo fresco en el que se estudió el efecto de la ionización electrónica en piezas, de unos 500 g, obtenidas a partir del lomo (*longissimus dorsi*) entero, en el caso del lomo adobado se prepararon filetes de 4-6 mm de espesor, como modelo de comercialización al detalle en hipermercados y supermercados envasados en bolsas de plástico de baja permeabilidad (copolímeros de poliamida/polietileno de 60 µm).

El tratamiento con electrones acelerados ocasionó una reducción de la carga bacteriana original de 1,6 y 2,2 D cuando se aplicaron 1 y 2 kGy, respectivamente, valores algo inferiores a los obtenidos en el caso del lomo fresco para el que se estimaron, respectivamente, reducciones de 2,0 y 3,6 D. Las diferencias no son muy distantes y pueden explicarse por el hecho de que la contaminación es un suceso aleatorio y los microorganismos que alcanzan el producto no tienen por qué presentar un comportamiento totalmente homogéneo, incluso perteneciendo a géneros iguales o afines.

Los cambios que se observaron durante el periodo de almacén mostraron un patrón similar a la evolución observada en el lomo fresco (véase el artículo que se recoge en el capítulo 4, resultados). Todas las consideraciones sobre la vida útil realizadas en el lomo fresco son, en general, aplicables a las lonchas de lomo adobado y no se van a repetir en este apartado. Baste con reflejar aquí (Tabla 5.2) las diferencias observadas en la ampliación de la vida útil de uno y otro producto.

Tabla 5.2 Vida útil*(días) de lomo fresco y adobado de cerdo no tratado (control) y tratado con electrones acelerados, almacenado 4 y 8 °C

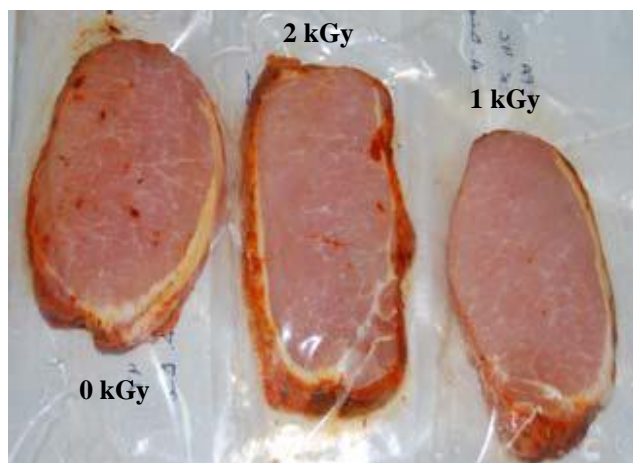
Dosis (kGy)	Fresco (4 °C)	Adobado (4 °C)	Fresco (8 °C)	Adobado (8 °C)
0	5	7	3	5
1	11	16	8	10
2	20	>20	16	16

* La vida útil se estableció cuando se alcanzó en el recuento de viables totales un valor de 5×10^7 ufc/cm²

Los datos de la tabla muestran que la vida útil del producto adobado fue mayor, tanto en las muestras no tratadas (controles) como en las sometidas al tratamiento ionizante. Como los valores del pH y de la a_w de ambas formas de comercialización (fresco y adobado) son similares, la mayor vida útil del lomo adobado se ha atribuido al efecto inhibidor de los ingredientes añadidos durante su elaboración, sobre todo, de las especias en las que se ha demostrado actividad antibacteriana (Billing y Sherman, 1998), especialmente sobre bacterias Gram negativas (Zaika y col., 1983).

En el lomo adobado, el color tal vez sea de mayor importancia inicialmente que en las piezas de lomo fresco. La incorporación de ingredientes durante el adobado hace que se realcen las tonalidades y, debido a que es muy común exponerlo en filetes en las vitrinas de los supermercados, el color superficial es fundamental para que el consumidor pueda apreciar su aspecto y decidir su adquisición. El análisis instrumental del color puso de manifiesto que el tratamiento con electrones acelerados afectó mínimamente al color, observándose mínimas diferencias en el parámetro a^* que fueron desapareciendo al transcurrir el tiempo de almacenamiento. Estas exiguas diferencias fueron menores que en el lomo fresco, lo que se ha atribuido a dos fenómenos; uno, a la fijación del color por el nitrito añadido y, el segundo, a una mimetización del color rojo-rosáceo por el pimentón utilizado en el adobado. En la figura 5.2 se muestra una fotografía de filetes de lomo tratados y del control. La imagen muestra nítidamente la práctica ausencia de diferencias.

Figura 5.2 Imagen de lomo de cerdo adobado sin tratar (0 kGy) y tras el tratamiento con electrones acelerados a diferentes dosis (1 y 2 kGy)



Las consideraciones realizadas en el lomo fresco respecto al olor y la textura pueden extrapolarse al lomo adobado. Estos atributos se consideran de menor transcendencia en el momento de adquisición puesto que el destino de ambos productos es ser cocinados previamente a su consumo y, por ello, sus propiedades reológicas y sensoriales cambiarán notablemente con el tipo de tratamiento culinario que se efectúe. Se insiste que el color es importante para su elección, y no por motivos derivados del cocinado que, ciertamente, también lo modificará.

5.3 Aspectos sanitarios (criterios de proceso respecto a *Listeria monocytogenes*)

La discusión de los aspectos sanitarios del lomo fresco y adobado se hace conjuntamente porque los conceptos, peligrosidad, regulaciones, etc. son idénticos para ambos productos.

5.3.1 Consideraciones generales

Algunos autores (Dainty y Mackey, 1992; Livingston y col., 2004) han indicado que la ampliación de la vida útil de los alimentos frescos mediante el uso de atmósferas modificadas, incluido el vacío, podría dar una oportunidad a las bacterias patógenas para su multiplicación y llegar a niveles peligrosos. Esta opinión se basa en dos argumentos: el primero, en que pudiera que los gases de la atmósfera no inhibieran, o potenciaran, el crecimiento de algunas bacterias patógenas vía alimentaria, produciéndose, por tanto, un incremento de su número durante el almacenamiento prolongado (Tamplin, 2002). El segundo argumento se basa en el hecho de que al inhibirse la microbiota alterante, las bacterias patógenas tendrían una menor competencia y podrían colonizar el alimento de una forma más rápida y fácil (Church y Parsons, 1995; Livingston y col., 2004). Estas circunstancias son similares al hecho de que una bacteria oportunista, *Staphylococcus aureus*, puede ocasionar numerosos brotes de intoxicación alimentaria cuando alcanza un número suficiente para producir enterotoxinas a niveles que provoque la enfermedad, lo que normalmente se produce cuando la microbiota acompañante no existe, o solo en bajas tasas, y las condiciones ambientales son favorables para el crecimiento de este microorganismo (Jay y col., 2009).

Este razonamiento puede también aplicarse en el caso de un alimento, en el presente caso lomo de cerdo fresco y adobado, al que se le aumenta la vida útil mediante el tratamiento con electrones acelerados; pudiera ocurrir que la bacteria patógena “diana” (véase más adelante) fuese más radiorresistente que la microbiota Gram negativa habitualmente alterante de la carne refrigerada y las células patógenas supervivientes al tratamiento, al encontrar una menor competencia, se multiplicaran hasta niveles peligrosos.

Es cierto que el producto protagonista de esta tesis es el lomo de cerdo que, bien fresco o adobado, no va a consumirse crudo sino tras algún tratamiento culinario, normalmente térmico, que destruirá las bacterias presentes, con lo que el consumidor estará protegido. Sin embargo, por un lado, el celo de las autoridades sanitarias de los países occidentales por salvaguardar la salud del consumidor ha conducido a la elaboración de

unas rigurosas normas microbiológicas, como “ausencia en 25 g”, equivalente a “tolerancia cero” que, por supuesto, se aplican a las bacterias patógenas más peligrosas que, si están presentes incluso en bajos niveles, se ponen de manifiesto fácilmente en las muestras que se toman para controlar el grado de inocuidad de la mercancía. Por otra parte, la importancia de la presencia de bacterias patógenas en un determinado producto va más allá, ya que mediante contaminaciones cruzadas, estas bacterias pueden alcanzar otros lotes de ese producto, o llegar a otros alimentos que se almacenan en las mismas cámaras frigoríficas (desde las industriales hasta los frigoríficos domésticos), se transportan en los mismos vehículos o se preparan en los mismos obradores y cocinas (desde grandes superficies e instalaciones de comedores colectivos hasta los frigoríficos y cocinas de restaurantes y domésticas). De aquí la necesidad de controlar (destruir/inhibir) los microorganismos patógenos.

5.3.2 Identificación del peligro

En primer lugar, conviene apuntar que la preparación de piezas máster de carne fresca destinada a su exportación conlleva una serie de manipulaciones que podrían originar la contaminación con microorganismos patógenos procedentes de los manipuladores, equipos mecánicos (cortadoras, envasadoras, etc.) o, mediante contaminaciones cruzadas, de otros alimentos. Si estas operaciones se realizan a bajas temperaturas (por ejemplo, 8-10 °C), con una vigilancia higiénica correcta y las piezas finales se llevan inmediatamente a cámaras refrigeradas, la contaminación se minimizará, pero no será posible evitar el crecimiento o la llegada de microorganismos alterantes y, ocasionalmente, la de patógenos. Adicionalmente, si es un producto formulado, como es el caso de lomo adobado, hay que contar también con la contaminación de los ingredientes.

Quizás sea oportuno también señalar que la higienización de un alimento mediante la aplicación de electrones acelerados, al igual que con otras tecnologías, pretende establecer unas condiciones mínimas de tratamiento para asegurar que el número de patógenos en el momento de su consumo tenga un valor suficientemente bajo para que la protección de la salud del consumidor quede garantizada. El ejemplo más claro, tal vez, es el de la pasteurización de la leche; en su día se diseñaron unas condiciones (63 °C, 30 minutos, o su equivalente, como el actual binomio tiempo-temperatura 72 °C, 15 segundos del proceso HTST), de acuerdo con la termorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*, que ocasionaban una reducción del número de esta bacteria del orden de 10-12 D, es decir, se

llegaba a un nivel estadísticamente despreciable. Como era la bacteria patógena no esporulada de mayor termorresistencia de entre las que se detectaban en la leche cruda, si se lograba la destrucción de la misma se aseguraba la ausencia de las demás. En el caso del tratamiento con radiaciones ionizantes de la carne, la situación es bastante similar; es necesario saber qué bacterias patógenas pueden alcanzar el producto durante su manipulación y con qué frecuencia, cuales son las más peligrosas para la salud humana y las características de las mismas, de forma especial su sensibilidad/resistencia a los tres parámetros más importantes que influyen en el crecimiento microbiano, específicamente el pH, la a_w y la temperatura, en este caso, la de refrigeración.

Los microorganismos patógenos por vía alimentaria que pueden llegar a la carne fresca, procedentes del entorno industrial, utillaje, manipuladores, etc., son fundamentalmente diversos serovares de *Escherichia coli*, incluido el O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*. La relevancia de estas bacterias es particular en cada caso. *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. pueden considerarse ubicuas, por lo que se detectan con cierta frecuencia en una enorme variedad de alimentos. No es necesario revelar cuál es la peligrosidad ni la frecuencia de *Salmonella* spp.; es bien conocido que ostenta el record de brotes alimentarios y, de hecho, universalmente se le aplica el criterio de “tolerancia cero”. *E. coli* O157:H7 es una bacteria causante de una severa enfermedad alimentaria y la característica más importante en el contexto alimentario es su resistencia a valores ácidos de pH y la baja dosis infectiva, lo que potencia su peligrosidad. *C. jejuni* llega probablemente a los humanos a través de contaminaciones cruzadas, ya que es una bacteria exigente en lo que se refiere a sus condiciones de cultivo y necesidades nutritivas, y su crecimiento a bajas temperaturas es totalmente nulo. Las más psicrótrofas son *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* y, casi puede garantizarse que, en condiciones de refrigeración estricta (sin sobrepasar 3-4 °C), serán las únicas que pueden multiplicarse, por lo que la multiplicación de las restantes en un alimento mantenido en refrigeración, si han llegado ocasionalmente, no va a producirse y suele quedar condicionado a un abuso de la temperatura de almacenamiento, hecho que, desgraciadamente, ocurre con relativa frecuencia en las grandes superficies y en los establecimientos de venta al detalle. No obstante, por una parte, la patogenicidad de *L. monocytogenes* es mucho mayor que la de *Y. enterocolitica* y, por otra, esta última bacteria, acorde con su carácter de Gram negativa, es mucho más sensible que *L. monocytogenes* a los agentes disgenésicos y deletéreos, en especial la a_w ,

dado que *L. monocytogenes* es la bacteria patógena más resistente a los descensos de este parámetro mientras que *C. jejuni* es extremadamente sensible. Estas circunstancias esenciales inclinan a decidir que el microorganismo “diana” en las carnes refrigeradas es *L. monocytogenes*.

5.3.3 Caracterización del peligro

No se va a describir en esta sección cuál es la patogenicidad de *L. monocytogenes*. Ha quedado recogida en el apartado 1.10 de la introducción y también se hace referencia al peligro que presenta en los artículos publicados que se han incluido en el capítulo 4 de resultados. Simplemente se añadirá que las listerias son bacterias muy frecuentes en los establecimientos alimentarios y son muy difíciles de eliminar debido a que se alojan, formando biofilms, en zonas muy recónditas de los equipos, como juntas y válvulas, donde pueden persistir durante años y en cualquier momento pueden contaminar el alimento, incluso si el producto ha estado libre de listerias durante meses (ICMSF, 2004). Por tanto, dado su carácter psicrotrofo, al alcanzar el alimento puede aumentar su número durante el almacenamiento hasta niveles peligrosos.

5.3.4 Planteamiento tecnológico

Desde un punto de vista de salud pública, el planteamiento tecnológico de la investigación fue la reducción del número de *L. monocytogenes* hasta un nivel tal que, teniendo en cuenta el periodo de almacenamiento a 4 °C, la carga final del microorganismo fuese suficientemente baja como para cumplir el objetivo de seguridad alimentaria respecto a los criterios aplicados en las regulaciones microbiológicas de los distintos países.

Se planteó estudiar, pues, si la aplicación de electrones acelerados era apropiada para conseguir la higienización del lomo fresco y adobado de la especie porcina mediante la aplicación de electrones acelerados a bajas dosis (<2,5 kGy), entendiendo por higienización la eliminación de los microorganismos patógenos no esporulados hasta un adecuado nivel de protección al consumidor.

5.3.5 Estimación de los parámetros de seguridad alimentaria: objetivo de seguridad alimentaria, criterio del rendimiento y criterio del proceso

5.3.5.1 Objetivo de seguridad alimentaria (FSO)

El FSO se define como el valor máximo admisible de la concentración y/o frecuencia de un peligro microbiano en un alimento en el momento del consumo que permite un nivel de protección adecuado (ICMSF, 2004). El FSO depende de diversos factores; entre otros, la dosis infectiva del microorganismo o microorganismos más representativos o de mayor importancia sanitaria en el producto, el tiempo de generación en el caso de que las condiciones imperantes permitan el crecimiento, el nivel inicial habitual por unidad de producto, las condiciones normales en que va a almacenarse o distribuirse hasta su venta y las prácticas culinarias y de consumo más implantadas.

Los análisis de estimación del riesgo realizados por las autoridades sanitarias de la mayoría de los países han llevado al establecimiento de unas normas microbiológicas que fijan la permisividad de la presencia de *L. monocytogenes* y así se ha plasmado en las regulaciones microbiológicas. Sin embargo, las autoridades sanitarias de unos y otros países no coinciden en relación con el criterio aplicado para *L. monocytogenes*. Los niveles establecidos en el Reglamento de la Comisión (CE) de la UE o por el USDA de EEUU se van a considerar como patrones y se van a establecer como equivalentes a los correspondientes FSO. Otros países se han acogido a uno de estos dos criterios o aplican soluciones intermedias que, en el caso de *L. monocytogenes*, han quedado recogidos en la tabla 1.5 de la introducción.

Nota aclaratoria: Por requisitos de las revistas y exigencias de sus editores, la discusión de los dos artículos publicados sobre los aspectos que se comentan en el presente apartado, se orientaron de acuerdo con las dosis aplicadas en los experimentos. Ahora, aunque se llegue a la misma conclusión, se va a discutir con más detalles la optimización del proceso, es decir la dosis de radiación mínima para conseguir el FSO en cada caso y si los tratamientos aplicados (1 y 2 kGy) son, o no, suficientes para lograr esa meta.

USDA no admite en ningún caso la presencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra, mientras que el reglamento (CE) de la Comisión distribuye los alimentos en tres categorías: una con una carga máxima de 100 ufc/g o cm², que automáticamente incluye a todos los productos refrigerados que se ajusten a los valores de las constantes que se

reflejan en la tabla 1.5 de la introducción y los que vayan a consumirse antes de los 5 días de librarlos al mercado. Una segunda categoría abarca a aquellos productos con una $a_w > 0,92$ (puede multiplicarse *L. monocytogenes*) con una vida útil mayor de 5 días (p. ej., todos los alimentos frescos de origen animal o vegetal y entre los procesados, pescados ahumado, productos cárnicos cocidos, nitrificados o no, etc.), subdividiendo este grupo de alimentos dependiendo si se puede demostrar que se ha aplicado algún método (p. ej., altas presiones, radiaciones ionizantes, u otro procedimiento) para asegurar que *L. monocytogenes* no superará el límite de 100 ufc/g o cm^2 que, en este caso, es la carga que establece la regulación en el momento del consumo. Si no se pudiera demostrar que el crecimiento de *L. monocytogenes* está controlado, el criterio que se le designa al alimento es “tolerancia cero”, igual que el de USDA. La tercera categoría corresponde a los alimentos RTE destinados a los lactantes y a usos médicos especiales; en este caso el criterio es siempre de "tolerancia cero".

De acuerdo con las regulaciones anteriores, tanto el lomo fresco como el adobado están dentro de la segunda categoría de la CE y, por tanto, habría que considerar, en conjunción con la regulación, un FSO de 100 ufc/ cm^2 (log 2,0), debido al efecto listericida de los electrones acelerados, aunque se podría exigir el criterio de “tolerancia cero” si las autoridades sanitarias de los países de destino así lo consideran. En el caso del producto destinado a EEUU (o a otros países con el mismo criterio) no hay otra opción que ajustarse a “ausencia en 25 g” y por razones de optimización del proceso se va a considerar un FSO de 4 ufc/100 g de material (log = -1,3979).

5.3.5.2 Criterio de rendimiento (CR) y criterio de proceso (CP)

El criterio de rendimiento (denominado también criterio de resultado) se define como el resultado requerido de una o más medidas de control en una etapa o combinación de etapas que, considerando el tiempo que queda hasta el consumo del alimento, contribuyen a garantizar la inocuidad del mismo (FAO, 2007; Gorris, 2005).

Para calcularlo es necesario conocer (o estimar) la carga inicial (H_0) de *L. monocytogenes*, es decir, la contaminación del producto con este microorganismo durante su preparación y envasado, así como el incremento de listerias durante la vida útil (Δ). Para ello, lo más oportuno quizás sea utilizar los argumentos y criterios que algunas instituciones (FDA, 1999, 2001, 2003; USDA/FSIS, 1999; ICMSF, 2004) han utilizado

para controlar *L. monocytogenes* en salchichas tipo Frankfurt que se manipulan tras la cocción, que es cuando puede producirse una contaminación post-proceso. Tomando una postura conservadora, la ICMSF (2004) estima que una recontaminación en operaciones posteriores a la cocción puede, en el peor de los casos, alcanzar la tasa de 10 células/g. Como las listerias están presentes en la mayoría de los hábitats, en el caso del lomo fresco o adobado la contaminación podría ser del mismo orden, de 10 células/g ($\log = 1$). Este es el argumento que se ha utilizado en otros productos en trabajos similares al presente (Cabeza y col., 2007) y que se va a considerar también en el actual estudio.

En un informe de la FDA (FDA, 2003) se recogen los datos de diversos investigadores sobre la velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en un buen número de alimentos, entre ellos productos cárnicos. De este documento puede deducirse un incremento medio del número de listerias de 0,2 y 0,35 unidades logarítmicas por día en la carne almacenada a 4 y 8 °C, respectivamente. Haciendo uso de estos parámetros de crecimiento de *L. monocytogenes*, el incremento (Δ) que se estime en la vida útil hallada para cada tratamiento (1 y 2 kGy) y temperatura de almacenamiento (4 y 8 °C) permitirá llegar a un CR más que suficiente para garantizar que se consigue el FSO, el cual puede calcularse aplicando la siguiente ecuación (ICMSF, 2004):

$$H_0 - CR + \Delta = FSO$$

Por ejemplo, si se considera una vida útil de 11 días (la del lomo fresco sometido a 1 kGy), un crecimiento de 0,2 unidades log al día, un FSO de 100 ufc/cm² ($\log = 2$) y una carga inicial de *L. monocytogenes* de 10 ($\log 1$) ufc/cm², el CD será de $1 - CR + 2,2 = 2$; de donde se tendrá un CR de 1,2; es decir, se requieren 1,2 reducciones decimales en la carga de listerias por cualquier procedimiento bactericida que se aplique que, en el presente caso, es mediante electrones acelerados.

El **criterio de proceso** es la dosis que hay que aplicar para reducir el número de listeria de acuerdo con el correspondiente CR (ICMSF, 2004); se calcula teniendo en cuenta la radiorresistencia (valor D) de *L. monocytogenes* en el producto (0,43 kGy) que, en el ejemplo anterior, será ($D \times CR = CP$) $0,43 \times 1,2 = 0,52$ kGy. En las tablas 5.4 y 5.5 se muestran los valores obtenidos para la higienización de lomo fresco y adobado, respectivamente.

Tabla 5.4 Optimización de la higienización, mediante electrones acelerados, de lomo fresco almacenado a 4 y 8 °C respecto a *L. monocytogenes* (D de *L. innocua* = 0,43 kGy) con arreglo a las regulaciones de la CE de UE y la USDA de EEUU para este microorganismo, asumiendo una carga inicial en el producto de 10 ufc/cm² (log = 1)

T (°C)	Dosis (kGy)	Vida útil (días)	Incremento (log)		CR (reducciones D)		CP (kGy)	
			Día	Vida útil	CE	USDA	CE	USDA
4	1	11	0,2	2,2	1,2	4,5	0,5	1,9
	2	20	0,2	4,0	3,0	6,4	1,3	2,7
8	1	8	0,35	2,8	1,8	5,2	0,8	2,2
	2	16	0,35	5,6	4,6	7,9	2,0	3,4

FSO-CE: 100 ufc/g ó cm² (log = 2)

FSO-USDA: 4 ufc/100 g ó cm² (log = -1,398)

Tabla 5.5 Optimización de la higienización, mediante electrones acelerados, de lomo adobado almacenado a 4 y 8 °C respecto a *L. monocytogenes* (D de *L. innocua* = 0,46 kGy) con arreglo a las regulaciones del CE de UE y la USDA de EEUU para la bacteria patógena, asumiendo una carga inicial en el producto de 10 ufc/cm² (log = 1)

T (°C)	Dosis (kGy)	Vida útil (días)	Incremento (log)		CR (reducciones D)		CP (kGy)	
			Día	Vida útil	CE	USDA	CE	USDA
4	1	16	0,2	3,2	2,2	5,5	1,0	2,6
	2	>20	0,2	4,0	3,0	6,4	1,3	2,9
8	1	10	0,35	3,5	1,8	5,2	1,2	2,7
	2	16	0,35	5,6	4,6	7,9	2,1	3,3

FSO-CE: 100 ufc/g ó cm² (log = 2)

FSO-USDA: 4 ufc/100 g ó cm² (log = -1,398)

Las tablas predicen que tanto el lomo fresco como el adobado destinado a países que, como los de la UE, permiten la presencia de 100 ufc/g o cm² superarán los controles que realicen las autoridades sanitarias en el punto de destino en cualquier momento de la vida útil, tanto si se le aplica una dosis de 1 kGy (vida útil 11 días) como si se someten a 2 kGy (vida útil 20 días), siempre que se mantenga la temperatura de almacenamiento a 4 °C. No obstante, a 8 °C se necesitarían aplicar 2 kGy. Claro está, no durante todo el transporte y periodo de almacén estarán a esa temperatura, ya que se supone que el fallo de la cadena del frío es intermitente con una duración de tiempo relativamente corta, por ejemplo, esperando que se cargue el vehículo en la antesala de los almacenes y vitrinas de exposición en los supermercados.

Las circunstancias no son iguales para los países que, como EEUU, han establecido el criterio de “tolerancia cero”. La vida útil del lomo fresco cuando se aplica 1 kGy es de 11 días a 4 °C pero se necesitan 1,9 reducciones decimales para que no se pueda detectar *L. monocytogenes* en 25 g de muestra. En el caso del lomo adobado la situación empeora porque la vida útil es algo mayor, de 16 días y *L. monocytogenes*, en las mismas

condiciones para multiplicarse, alcanzará una unidad logarítmica más en esos 5 días de diferencia. Con la dosis de 2 kGy, siempre que el almacenamiento sea a 4 °C sin interrupción alguna, se necesitan tratamientos que ocasionen 2,7 y 2,9 reducciones decimales para asegurar que no se detectará *L. monocytogenes*.

Ahora bien, en un intento de minimizar las posibilidades de multiplicación de *L. monocytogenes* en el lomo, tanto fresco como adobado, tratado con electrones acelerados con el fin de que resulte negativa la detección de esta bacteria mediante enriquecimiento, o sea, de que satisfaga el criterio de ausencia en 25 gramos, se podría argumentar lo siguiente:

- 1º) *L. innocua* es más radorresistente que *L. monocytogenes* y puede, por tanto, que la bacteria patógena no llegue a los niveles necesarios para su detección. En este sentido, el equipo al que la autora está adscrita ha demostrado, con la misma fuente de electrones e idéntica metodología, valores de una y otra bacteria de 0,49 vs 0,42 en jamón cocido (Cabeza y col., 2007), 0,47 vs 0,32 en jamón curado (de la Hoz y col., 2008), 0,64 vs 0,48 en carne picada de cerdo (Cabeza y col., 2011) y de 0,57 vs 0,49 en cecina (Cambero y col., 2012).
- 2º) Se podría bajar la temperatura de almacenamiento durante el transporte, por ejemplo un par de grados, con lo que se conseguiría aumentar la vida útil. Se ha informado que con el descenso de temperatura los tiempos de generación de *L. monocytogenes* podrían superar las 130 horas (ICMSF, 1996c). No obstante, encarecería el producto y, probablemente, se produciría más fácilmente un abuso de temperatura.
- 3º) Un argumento más importante deriva de la publicación de Cabeza y col. (2010). Estos autores han observado en jamón cocido que tanto la fase de latencia como la exponencial de células de *L. monocytogenes* supervientes al tratamiento con electrones acelerados se amplían significativamente, lo que atribuyeron a la demora en reparar los daños subletales producidos por el tratamiento. Por ejemplo, al aplicar 2 kGy, la fase de latencia de los supervientes a la temperatura de 7 °C fue de 5 días y el valor g aumentó de 25 horas (en las muestras no tratadas) a 125 horas. Es cierto que el jamón cocido tiene una a_w más baja que el lomo fresco (alrededor de 0,95 frente a 0,98, respectivamente), lo que provocará un descenso de la velocidad de crecimiento. De hecho, se ha descrito un valor g

de *L. monocytogenes* a 8 °C de 10,6-13,1 horas (Rosenow y Marth, 1987; Ryser y Marth, 1988), aproximadamente un 50% de la ofrecida por Cabeza y col. (2010). Por otra parte, los datos anteriores se han obtenido a temperaturas de 7-8 °C. Pero si, en el caso más favorable, la respuesta es similar, puede tomarse ese 50% como lo que podría ocurrir en carne fresca almacenada a 4 °C. Entonces, se estaría hablando de un valor *g* de unas 65 horas (2,6 días), de tal forma que con dosis de 2 kGy en 20 días de almacenamiento se produciría apenas un incremento de 2 unidades logarítmicas, lo que unido a la fase de latencia permite presumir que se alcanzaría el objetivo.

En resumen, puede decirse que la aplicación de electrones acelerados a dosis de 2 kGy a lomo fresco y adobado permite aumentar la vida útil del producto hasta unos 20 días. Desde el punto de vista sanitario se cumplirían las regulaciones establecidas por la CE de la UE, o la de países terceros con el mismo criterio microbiológico. No se garantiza el cumplimiento del criterio más exigente de “tolerancia cero”, pero se presume que, dado los daños producidos por el tratamiento, es muy probable que las listerias supervivientes presentaran una velocidad de crecimiento más lenta, por lo que también se cumpliría tal criterio. No obstante, queda pendiente de demostrar esta hipótesis en un trabajo futuro.

5.4 Otros aspectos de calidad del lomo tratado con electrones acelerados

En el capítulo de Resultados de esta Tesis Doctoral se incluyen, además de los ya referenciados García-Márquez y col. (2012a y 2012b), tres artículos en los que se analiza el efecto del tratamiento con electrones acelerados en distintos componentes y características. El objetivo del publicado bajo el título “*Changes in the phospholipid fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage*”, fue estudiar el efecto del tratamiento ionizante (1 y 2 kGy) en la fracción fosfolipídica del material lipídico de la carne, unido a la influencia que pudiera tener el tipo de envasado (aire, vacío y atmósfera modificada) y la temperatura de almacenamiento (4 y 8 °C). Se ha realizado una búsqueda bibliográfica acerca de los trabajos de otros autores sobre los cambios en la fracción fosfolipídica de la carne (u otros alimentos) debido a tratamientos mediante radiaciones ionizantes. No ha sido posible encontrar referencias al respecto. Por tanto, con la cautela debida, la autora estima que es el primer trabajo que se realiza sobre el tema.

El razonamiento que se hizo se basaba en que los lípidos, sin considerar los ácidos nucleicos, son generalmente las macromoléculas más sensibles a los métodos de conservación físicos (calor, radiaciones ionizantes, pulsos de luz, luz ultravioleta, etc.) y químicos (atmósferas oxidantes) y dentro de los lípidos, los fosfolípidos son los más lábiles debido a que contienen los mayores porcentajes de ácidos grasos insaturados, lo que podría favorecer la oxidación de éstos con la concomitante pérdida parcial de algún tipo de fosfolípido. De hecho, las radiaciones ionizantes provocan, sobre todo en los tejidos con gran contenido de humedad, como la carne fresca, la radiolisis del agua generándose radicales libres OH^\cdot , H^\cdot , H_2^\cdot , OH^- , e^- y cantidades muy pequeñas de ozono (Olson, 1998) y peróxido de oxígeno (Whitburn y col., 1982). Son sustancias altamente oxidantes que pueden acarrear la degradación de los ácidos grasos.

Tanto en el producto tratado como en el control se identificaron fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, esfingomielina, cardiolipina y lisofosfatidilcolina. Se trata de los fosfolípidos que habitualmente se han descrito en carne y productos derivados (Meynier y col., 1998). El tratamiento estadístico global desveló ligeros cambios en algún fosfolípido, como la cardiolipina, en el lomo fresco durante el almacenamiento y al comparar los resultados obtenidos con las distintas atmósferas empleadas en el envasado. No obstante, no se observaron diferencias en el lomo adobado, lo que se atribuyó a los aditivos añadidos en la elaboración de este producto, algunos con actividad antioxidante, como el ascorbato.

Sin embargo, el resultado más importante fue que el tratamiento con electrones acelerados *per se*, incluso a 2 kGy, no afectó en absoluto a la integridad de los diferentes fosfolípidos, concluyéndose que esta tecnología a las dosis ensayadas puede ser una eficaz herramienta para ampliar la vida útil del lomo fresco y adobado sin afectar a las, tal vez, más sensibles macromoléculas que componen la carne.

El segundo artículo con el título “*Changes in the volatile compounds of pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage*”, se refiere al estudio de los cambios en las sustancias volátiles de la carne tratada con electrones acelerados y almacenada a 4 y 8 °C en diferentes atmósferas (aire, vacío y atmósfera modificada). La redacción del artículo se ha realizado con un criterio riguroso reflejando con precisión los datos obtenidos. Sin embargo, estos merecen una discusión adicional para

aclarar algunos resultados que pudieran parecer inconsistentes con los conocimientos actuales sobre la alteración de la carne.

Las bacterias Gram negativas psicrotrofas productoras de sustancias viscosas, fundamentalmente la del género *Pseudomonas*, en la mayoría de los casos son, como repetidas veces ya se ha indicado, las responsables de la alteración de la carne fresca almacenada en condiciones aeróbicas (Dainty y col., 1983), pero su crecimiento se inhibe eficazmente por el dióxido de carbono (Christopher y col., 1979), siendo reemplazadas en gran extensión por organismos resistentes al CO₂, fundamentalmente BAL y *Brochothrix thermosphacta* (Newton y col., 1977; Asensio y col., 1988), habiéndose informado que son las principales bacterias causantes de la alteración de la carne refrigerada envasada a vacío (Dainty y col., 1979; Simard y col., 1985) y en atmósferas modificadas (MAP) enriquecidas en CO₂ (Simard y col., 1985) o en CO₂ y O₂ (Ordóñez y col., 1991). Aunque se tengan unos conocimientos muy claros y concluyentes de la evolución de la microbiota en la carne almacenada bajo refrigeración envasada en las atmósferas anteriormente mencionadas, no es fácil precisar el fin de la vida útil del producto a vacío o en MAP porque el número máximo de células viables de estas bacterias es típicamente inferior a 10⁸ ufc/cm² y puede permanecer a estos niveles durante semanas (Dainty y col., 1983), presumiblemente debido a una combinación del bajo rendimiento de la fermentación de la glucosa de la carne y de la exigua concentración de otros compuestos de bajo peso molecular en la misma. Sin embargo, las sustancias finales odoríferas resultantes del metabolismo microbiano se van acumulando progresivamente en la matriz cárnica emitiendo los típicos olores de carne envasada a vacío que se han descrito como “a láctico”, “lechería”, “queso fermentado”, etc.

En concordancia con el modelo de alteración descrito, se podría esperar la detección de volátiles resultantes de las actividades metabólicas de las bacterias dominantes en la carne envasada en las distintas condiciones (atmósfera y temperatura). En aerobiosis, se deberían haber identificado volátiles azufrados, como dimetil sulfuro, metiltioacetato, metiltiopropionato, *bis*-metiltiometano y dimetil trisulfuro, todos ellos generados comúnmente por las pseudomonas (Dainty y col., 1984; Edwards y col., 1987). Sin embargo, salvo el dimetil sulfuro, no se detectaron siquiera en la muestra sin tratar que se debiera haber alterado antes.

Por otra parte, *B. thermosphacta* es una bacteria anaerobia facultativa. En condiciones de aerobiosis produce 3-hidroxibutanona (acetoina), ácidos isobutírico e isovalérico (Dainty y Hibbard, 1983; Dainty y Hofman, 1983), 3-metilbutanol (Dainty y Hofman, 1983) y ácido 2-metilbutírico (Dainty y Hibbard, 1983). Sin embargo, cuando la atmósfera contiene poca concentración de oxígeno, el metabolismo de este microorganismo cursa con un modelo anaeróbico, rindiendo a partir de la glucosa (80-90% de la glucosa metabolizada), ácido L (+) láctico (no volátil) y etanol en la proporción 3:1 (Hitchener y col., 1979). No se detectaron ninguna de las sustancias mencionadas.

Finalmente, las BAL y *B. thermosphacta* (Mellerick y Cogan, 1981; Stanley y col., 1981) producen, en la carne envasada a vacío, 3-hidroxibutanona y 2,3-butanodiona, incluso se han propuesto, junto con el ácido D (-) láctico (De Pablo y col., 1989), como indicadores potenciales de la calidad microbiológica de la carne y productos cárnicos envasados a vacío. Ninguna de las dos cetonas se detectó entre los volátiles.

Los asertos recogidos en los párrafos anteriores están en total desacuerdo con los volátiles detectados tanto en el lomo fresco como en el adobado envasados en aire, a vacío y en MAP porque algunos de ellos se deberían haber detectado. No es fácil hallar una razón que satisfaga la discrepancia. La única explicación posible puede derivar de la sensibilidad del método utilizado para la extracción de los volátiles. Por ejemplo, la 3-hidroxibutanona y la 2,3-butanodiona están ausentes en la carne fresca (Stanley y col., 1981), pero De Pablo y col. (1989), con el fin de conocer la evolución de estas sustancias durante el almacenamiento de carne de cerdo envasada a vacío, utilizaron en sus experimentos un método enzimático extremadamente sensible. El nivel de detección de este métodos se encuentra alrededor de $\mu\text{g}/100\text{g}$ versus 10 mg/Kg del utilizado en los experimentos que se describen en el artículo de esta tesis. Es decir, el método enzimático es unas 1000 veces más sensible. Se necesitaron 15 días para, mediante el método enzimático, registrar una tasa de $15\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$ de diacetilo en carne de cerdo, lo que no podría detectarse en el lomo envasado a vacío, ni siquiera en cantidades trazas, con el método de extracción utilizado.

Otra posible explicación de las discrepancias anotadas previamente pueden fundamentarse en el nivel de la microbiota total que se eligió para definir la vida útil. Fue de 10^7 ufc/g de acuerdo con criterios previos (Cabeza y col., 2007). Dicha concentración celular se alcanzó en 5 y 7 días a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las muestras de lomo fresco (García-Márquez y

col., 2012a) y marinado (García-Márquez y col., 2012b), respectivamente. Una vez se llegó el nivel mencionado, los experimentos se dieron por concluidos y las muestras no pasaron a los respectivos análisis. Probablemente, las muestras se retiraron en un tiempo demasiado corto, insuficiente para que se acumulara un nivel tal, de las mencionadas cetonas, que permitiera su detección por el sistema de purga y trampa que se utilizó en la extracción de volátiles. Estas consideraciones no son válidas para las muestras tratadas con electrones acelerados debido a la diferente radiorresistencia de los microorganismos implicados en la alteración de la carne. En este contexto, las BAL son más resistentes al tratamiento ionizante que las pseudomonas, como puede extraerse de los valores D descritos para estos microorganismos. Un valor D típico de *Pseudomonas* spp. es de 0,08 kGy (Patterson, 1988) y el de las BAL es notablemente superior, del orden de 0,5 kGy. Pudiera ocurrir entonces que las pseudomonas fuesen reducidas a niveles extremadamente bajos y la alteración, incluso en aerobiosis, corriera a cargo de organismos imprevistos pertenecientes a otras clases bacterianas. Este postulado podría hacerse extensivo a otros volátiles.

Cualquiera que sea la razón de los resultados obtenidos, el hecho de mayor importancia de acuerdo con el objetivo de la presente investigación es la ausencia de diferencias en la composición de volátiles en ambos tipos de carne (fresca y adobada) entre las muestras tratadas con electrones acelerados y sus controles, incluso cuando se aplicaron dosis de 2 kGy, lo que permite concluir una vez más que esta tecnología es muy útil para ampliar la vida útil del lomo fresco y marinado.

El tercer artículo, titulado “*Characterization and quantification of the cholesterol oxidation product fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage*”, se refiere a la generación de óxidos de colesterol (del inglés, *cholesterol oxidation products*, COPs) en muestras de carne fresca y adobada tratada con electrones acelerados y envasada en diferentes condiciones (atmósfera, temperatura y tiempo de almacenamiento). Se detectaron siete COPs en ambos tipos de productos, pero el resultado de mayor transcendencia fue que el tratamiento no influyó en absoluto en la formación de estos compuestos. Otros resultados de menor importancia, totalmente ajenos al objetivo del trabajo, se refieren a las diferencias de COPs entre ambos productos y al efecto de las condiciones de almacenamiento en la generación de los mismos. Por ejemplo, en el lomo adobado se detectó un nivel menor de óxidos de colesterol que en el fresco, lo que puede atribuirse al contenido de sustancias antioxidantes

naturalmente presentes en el pimentón usado para el adobo (Markus y col., 1999). En el lomo fresco se observaron diferencias significativas en el $5\alpha,6\alpha$ -epoxi-colestano ($p < 0,05$) y 5-colesten- $3\beta,25$ -diol ($p < 0,001$) dependiendo del tiempo de almacenamiento. En cambio, no hubo diferencias en el lomo adobado. Del mismo modo, la temperatura de almacenamiento sólo afectó al 5-colesten- $3\beta,25$ -diol ($p < 0,05$) en el lomo fresco. Las atmósferas utilizadas en el envasado (aire, vacío y enriquecida en dióxido de carbono) apenas influyeron en la formación de COPs, ya que sólo se detectaron diferencias en el lomo fresco envasado en aire y en atmósfera modificada (MAP) para el 5-colesten- $3\beta,7\beta$ -diol ($p < 0,05$). En cambio, no se detectó ninguna diferencia en los COPs del lomo adobado respecto a las condiciones antes mencionadas.

Puede concluirse, pues, que la aplicación de electrones acelerados puede ser una herramienta válida para ampliar la vida útil del lomo fresco y adobado sin que se produzcan cambios en la composición de los COPs.

6 CONCLUSIONES

1. La vida útil del lomo fresco de cerdo, almacenado en refrigeración a 4 °C, se puede extender de 5 a 11 y 18-20 días por la aplicación de 1 y 2 kGy, respectivamente. Del mismo modo, si se produjera un abuso de temperatura (8 °C), la vida útil se ampliaría de 3 a 8 y 16 días, respectivamente, al aplicar la misma dosis, sin que la calidad sensorial quede comprometida. Asimismo, estos tratamientos garantizan un producto libre de *Listeria monocytogenes*.
2. El tratamiento de electrones acelerados de lomo adobado de cerdo ocasiona un notable aumento de la vida útil en muestras mantenidas a 4 °C, de 7 a 16 y más de 20 días con la aplicación de 1 y 2 kGy, respectivamente. En caso de abuso de temperatura (8 °C), la extensión de la vida útil sería de 5 a 10 y 16 días, respectivamente. Del mismo modo que en la carne fresca, las dosis anteriores reducen el número de *Listeria monocytogenes* hasta niveles estadísticamente despreciables.
3. El tratamiento con electrones acelerados no afecta a la fracción de fosfolípidos de ambos tipos de lomo, aunque pueden producirse mínimos cambios en estos compuestos debidos a las condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, el contenido de cardiolipina y esfingomielina puede verse afectado por el tipo de lomo o el de cardiolipina por la temperatura de almacenamiento.
4. Las sustancias volátiles de la carne de cerdo no se ven afectadas por la aplicación de electrones acelerados, incluso a dosis de 2 kGy. Sin embargo, se detectan importantes diferencias entre las muestras de lomo fresco y adobado, sobre todo en los terpenos, que derivan de los ingredientes, especialmente del pimentón. Asimismo, pueden aparecer diferencias menores debidas al tipo de envasado y a la temperatura de almacenamiento.
5. El tratamiento de irradiación no origina la formación de óxidos de colesterol. Sin embargo, estos compuestos se detectan en ambos tipos de lomo y su formación depende del tipo de envasado, de la temperatura y tiempo de almacenamiento. Cabe destacar que la generación de estas sustancias es significativamente menor en el lomo adobado, probablemente debido a los antioxidantes del pimentón.

Conclusión general

La aplicación de electrones acelerados entre 1 y 2 kGy es una tecnología muy eficaz para ampliar la vida útil de carne de cerdo fresca y adobada y conseguir el objetivo de seguridad alimentaria, sin que se originen cambios importantes en los atributos composicionales, texturales y sensoriales.

7 BIBLIOGRAFÍA

Aaslyng, M.D.; Bejerholm, C.; Ertbjerg, P.; Bertram, H.C. y Andersen, H.J. 2003. Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. **Food Quality and Preference**. **14**: 277-288.

Abbott, M.T.; Pearson, A.M.; Price, J.F. y Hooper, G.R. 1977. Ultrastructural changes during autolysis of red and white porcine muscle. **Journal of Food Science**. **42**: 1185-1188.

Aberle, E.D.; Forrest, J.C.; Gerrard, D.E. y Mills, E.W. 2012. Principles of Meat Science. 5th ed. Kendall Hunt Publishing Company, Dubuque, IA.

AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria). 2005a. Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Dirección Ejecutiva, en relación con la aplicación de altas presiones en carne y productos cárnicos. **Revista del Comité Científico**. **1**: 36-71.

AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria). 2005b. Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. **Revista del Comité Científico de la AESAN**. **2**: 11-43.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2013. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la aplicación de las radiaciones ionizantes para la higienización de la carne fresca, los preparados cárnicos y los productos cárnicos. **Revista del comité científico de la AESAN**. **18**: 29-52.

Ahn, D.U., Olson, D.G., Jo, C., Chen, X., Wu, C. y Lee, J.I. 1998. Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production, and color in raw pork patties. **Meat Science**. **49**: 27-39.

Ahn, D.U.; Kim, I.S. y Lee, E.J. 2013. Irradiation and additive combinations on the pathogen reduction and quality of poultry meat. **Poultry Science**. **92**: 534-545.

Ahn, H.J.; Kim, J.H.; Jo, C.; Lee, J.W.; Yook, H.S. y Byun, M.W. 2004. Effects of gamma irradiation on residual nitrite, residual ascorbate, color and N-nitrosamines of cooked sausage during storage. **Food control**. **15**: 197-203.

Aickin, C.C. y Thomas R.C. 1975. Micro-electrode measurement of the internal pH of crab muscle fibres. **Journal of Physiology**. **3**: 803-815.

Al-Ghazali, M.R. y Al-Azawi, S.K. 1990. *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. **Journal of Applied Bacteriology**. **69**: 642-647.

Aliste, A.J.; Vieira, F.F. y Del Maestro, N.L. 2000. Radiation effects on agar, alginates and carrageenan to be used as food additives. **Radiation Physics and Chemistry**. **57**: 305-308.

Andersen, J.K. 1988. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**. **7**: 193-202.

Andrews, L.S.; Marshall, D.L. y Grodner, R.M. 1995. Radiosensitivity of *Listeria monocytogenes* at various temperatures and cell concentrations. **Journal of Food Protection**. **58**: 748-751.

Anellis, A. y Koch, R.B. 1962. Comparative resistance of strains of *Clostridium botulinum* spores to gamma rays. **Journal of Applied Microbiology**. **10**: 326-330.

Anellis, A.; Berkowitz, D. y Kemper, D. 1977. Comparative radiation death kinetics of *Clostridium botulinum* spores at low-temperature gamma irradiation. **Journal of Food Protection**. **40**: 313-316.

Anellis, A.; Cichon, C.J. y Raymann, M.M. 1960. Resistance of *Bacillus coagulans* spores to gamma rays. Application of the multiple tube probability method. **Food Research**. **25**: 285-295.

Anónimo. 1986. Reports of outbreaks of foodborne illness. **California Morbidity**. **37**:1.

ANICE (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España). 2015. Disponible en: http://www.anice.es/v_portal/apartados/apartado.asp?te=7&npag=1

AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 1995. Official methods of analysis (16^a ed.). Washington DC.

Appleby, J. y Barks, A.J. 1905. British patent no. 1609.

Archer, M.C. y Tannenbaum, S.R. 1979. Vitamins. En “Nutritional and Safety Aspects of Food Processing”. S.R. Tannenbaum (ed.), págs. 47-95. M. Dekker Inc. Nueva York.

Arguedas, P. 1995. Control de Calidad para el Manejo de Animales de Granja, pág. 28. UNED.

Armstrong, S.G.; Wyme, S.G. y Leach, D.N. 1994. Effects of preservation by gamma-irradiation on the nutritional quality of Australian fish. **Food Chemistry**. **50**: 351- 357.

Arvanitoyannis, I.S. 2010. Irradiation of Food Commodities: Techniques, Applications, Detection, Legislation, Safety and Consumer Opinion. Elsevier Ltd. Oxford.

Arvanitoyannis, I.S.; Statakis, C.A. y Mente, E. 2009a. Impact of irradiation on fish and seafood shelf life: a comprehensive review of application and irradiation detection. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. **49**: 68-112.

Arvanitoyannis, I.S.; Statakis, C.A. y Tsarouhas, P. 2009b. Irradiation applications in vegetables and fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. **49**: 427-462.

Asensio, M.A.; Ordóñez, J.A. y Sanz, B. 1988. Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf life of refrigerated pork packed in plastic bags. **Journal of Food Protection**. **51**: 356-360.

Asghar, A. y Henrickson, R.L. 1982. *Post mortem* stimulation of carcasses: effects on biochemistry, biophysics, microbiology and quality of meat. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** **18**: 1-58.

Ayres, J.C. 1960a. Temperature relationships and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef. **Food Research**. **25**: 1-18.

Ayres, J.C. 1960b. The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. **Journal of Applied Bacteriology**. **23**: 471-486.

Azadian, B.S.; Finnerty, G.T. y Pearson, A.D. 1989. Cheese borne listeria meningitis in immunocompetent patient. **Lanceti**. **1**: 322-323.

Bandekar, J.R.; Chander, R. y Nerkar, D.P. 1987. Radiation control of in shrimp, *V. parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**. **8**: 83-88.

Banks, W.T.; Wang, C. y Brewer, M.S. 1998. Sodium lactate/sodium tripolyphosphate combination effects on aerobic plate counts, pH and color of fresh pork Longissimus muscle. **Meat Science**. **50**: 499-504.

Bannister, B.A. 1987. *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eating soft cheese. **Journal of Infection**. **15**: 165-168.

Baranyi, J. y Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**. **23**: 277-294.

Barbosa, W.B.; Cabedo, L.; Wederquist, H.J.; Sofos, J.N. y Schmidt, G.R. 1994. Growth variation among species and strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. **57**: 765-769.

Barret, A.J. 1973. Purification and some properties of the enzyme. **Biochemical Journal**. **131**: 809-822.

Battista, J.R. 1997. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. **Annual Review of Microbiology**. **51**: 203-224.

Beebe, S.D.; Vanderzant, C.; Hanna, M.O.; Carpenter, Z.L. y Smith, G.C. 1976. Effect of initial internal temperature and storage temperature on the microbial flora of vacuum packaged beef. **Journal of Milk Food Technology**. **39**: 600-605.

Beguiristain, N.; Fuentes, C.; Pintó, R. y Bosch, A. 2011. Nuevas técnicas de eliminación de virus en alimentos. En “Productos Cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables”. J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba y J. Ventanas (eds.), págs. 197-200. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones, Cáceres.

Belitz, H.D.; Grosch, W. y Schieberle, P. 2012. Química de los alimentos. 3ª ed. Ed. Acirbia, Zaragoza. ISBN: 978-84-200-1162-2.

Bendall, J.R. 1951. The shortening of rabbit muscles during rigor mortis. Its relation to the breakdown of adenosine triphosphate and creatine phosphate and to muscular contraction. **The Journal of Physiology**. **114**: 71-88.

Bendall, J.R. 1960. *Postmortem* changes in muscle. En “The Structure and Function of Muscle”. G.H. Bourne (ed.), pág. 227. Academic Press. Nueva York.

Bendall, J.R. 1973. *Post mortem* changes in muscle. En “The Structure and Function of Muscle”, 2ª ed. G.H. Bourne (ed.), págs. 243-309. Academic Press, New York.

Benedito, J.; Cambero, M.I.; Ortuño, C.; Cabeza, M.C.; Ordóñez, J.A. y L. de la Hoz. 2011. Modeling and optimization of sensory changes and shelf-life in vacuum-packaged cooked ham treated by E-beam irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**. **80**: 505-513.

Bigelow, W.D. y Esty, J.R. 1920. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organism. **Journal of Infectious Diseases**. **27**: 602-617.

Bille, J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. En “Foodborne Listeriosis”. A.J. Miller, J.L. Smith y G.A. Somkuti (eds.), págs. 71-74. Amsterdam.

Billing, J. y Sherman, P. 1998. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. **Quarterly Review of Biology**. **73**: 3-49.

Blanch, G.P.; Caja, M.D.; Flores, G. y del Castillo, M.L.R. 2009. Identification of 2-dodecylcyclobutanone and linear-alkanes as irradiation markers in sliced dry-cured ham. **Food Chemistry**. **113**: 616-620.

Bodwell, C.E. y Anderson, B.A. 1986. Nutritional composition and value of meat and meat products. En “Muscle as Food. Food Science and Technology”. P.J. Bechtel (ed.). Series ed. B.S. Schweigert. Academic Press, Inc. New York.

Bodwell, C.E. y McClain, P.E. 1976. Composición química de los tejidos animales. En “Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos”. J.F. Price y B.S. Schweigert (eds.), pág. 668. Ed. Acribia. Zaragoza.

Boleman, S.J.; Boleman, S.L.; Miller, R.K.; Taylor, J.F.; Cross, H.R.; Wheeler, T.L.; Koohmaraie, M.; Shackelford, S.D.; Miller, M.F.; West, R.L.; Johnson, D.D. y Savell, J.W. 1997. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. **Journal of Animal Science**. **75**: 1521-1524.

Bolyai, J.Z.; Smith, R.P. y Gray, C.T. 1972. Ascorbic acid and chemically induced methemoglobinemias. **Toxicology and Applied Pharmacology**. **2**: 176-185.

Bourne, M.C. 1978. Texture profile analysis. **Food Technology**. **32**: 62-72.

Bourne, M.C. 1979. Rupture test vs small-strain test in predicting consumer response to texture. **Food Technology**. **33**: 67-70.

Bourne, M.C. 2002. Food texture and viscosity: concept and measurement. M.C. Bourne (ed), pág. 427. 2ª ed. Academic Press, New York.

Bradshaw, J.G.; Peeler, J.T.; Corwin, J.J.; Hunt, J.M. y Twedt, R.M. 1987. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **Journal of Food Protection**. **50**: 543-556.

Brewer, M.S. 2004. Irradiation effects on meat color- a review. **Meat Science**. **68**: 1-17.

Brewer, M.S. 2009. Irradiation effects on meat flavor- a review. **Meat Science**. **81**: 1-14.

Brigide, P. y Caniatti-Brazaca, S.G. 2006. Antinutrients and “in vitro” availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**. **98**: 85-89.

Brito, M.S.; Villavicencio, A.L.C.H. y Mancini, J. 2002. Effects of irradiation on trans fatty acids formation in ground beef. **Radiation Physics and Chemistry**. **63**: 337-340.

Brody, A. 1996. Envasado de alimentos en atmósferas controladas, modificadas y a vacío. Pág. 213. Editorial Acribia. Zaragoza.

Brody, A.L. 2007. Case-ready packaging for fresh meat. **Food Technology**. **61**: 70-72.

Brooks, B.W. y Murray, R.G.E. 1981. Nomenclature for “*Micrococcus radiodurans*” and other radiation resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen nov., including five species. **International Journal of Systematic Bacteriology**. **31**: 353-360.

Broome, C.V.; Gellin, B. y Schwartz B. 1990. Epidemiology of Listeriosis in the United States. En: “Foodborne Listeriosis”. A.J. Miller, J.L. Smith y G.A. Somkuti (eds.), págs. 61-65. Elsevier Science Pub. Nueva York.

Brown, W.D. y Mebine, L.B. 1969. Autoxidation of oxymyoglobins. **Journal of Biological Chemistry**. **244**: 6696-6701.

Brynjolfsson, A. 1989. Future radiation sources and identification of irradiated foods. **Food Technology**. **43**: 84-89.

Buchanan, R.L.; Damart, W.G.; Whiting, R.C. y van Schothorst, M. 1997. Use of epidemiological and food survey data to estimate a purposefully conservative dose response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. **Journal of Food Protection**. **60**: 918-922.

Buchanan, R.L.; Edelson, S.G.; Snipes, K. y Boyd, G. 1998. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**. **64**: 4533-4535.

Cabeza, M.C.; Cambero, M.I.; de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. 2007. Optimization of E-beam treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. **8**: 299-305.

Cabeza, M.C.; Cambero, M.I.; Núñez, M.; Medina, M.; de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. 2010. Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. **Food Microbiology**. **27**: 777-782.

Cabeza, M.C.; de la Hoz, L.; Cambero, M.I.; Velasco, R.; García-Márquez, I.; Manzano, S. y Ordóñez, J.A. 2011. Capítulo 3. Ponencias temáticas destacadas de las sesiones plenarias, del Máster y del Curso Internacional. En “Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables”. J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba y J. Ventanas (eds.), págs. 167-177. Universidad de Extremadura. Cáceres.

Cabeza, M.C.; de la Hoz, L.; Velasco, R.; Cambero, M.I. y Ordóñez, J.A. 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. **Meat Science**. **83**: 320-327.

Calderón, T. 2000. La irradiación de alimentos. Principios, realidades y perspectivas de futuro. Ed. Mc. Graw Hill/Interamericana de España. Madrid.

Cambero, M.I.; García de Fernando, G.D. y Medina, M. 2013. Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de la carne y sus derivados. En “Avances en la producción de elaborados cárnicos seguros y saludables”. J.A. Ordóñez, F. Jiménez-Colmenero y J. Arnau (eds.), págs. 81-102. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. Barcelona.

Cambero, M.I.; Cabeza, M.C.; Escudero, R.; Manzano, S.; García-Márquez, I.; Velasco, R. y Ordóñez, J.A. 2012. Sanitation of selected ready-to-eat intermediate-moisture foods of animal origin by E-beam irradiation. **Foodborne Pathogens and Disease**. **9**: 594 -599.

Carballo, B. y López de Torre, G. 1991. Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Servicio de Investigación Agraria de la Junta de Extremadura.

Cárcel, J.A.; García-Pérez, J.V.; Riera, E.; Rosselló, C. y Mulet, A. 2014, Drying Assisted by Power Ultrasound. En “Modern Dry Technology. Vol.5 Process Intensification”. E. Tsotsas y A.S. Mujundar, (eds.). Wiley-VCH, In Press.

Carpenter, J.A.; Saffle, R.L. y Kamstra, L.D. 1961. Tenderization of beef by prerigor infusion of a chelating agent. **Food Technology**. **15**: 197-198.

Carpenter, R.; Lyon, D. y Hasdell, T. 2002. Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos Pág. 191. Ed. Acribia. Zaragoza.

Carpentier, B. y Chassaing, D. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. **International Journal of Food Microbiology**. **97**: 111-122.

CFR (Code of Federal Regulations). 21 CFR 179.26. Food and Drugs Administration. 2014. Department of Health and Human Services. Food for human consumption.

Irradiation in the production, processing and handling of food. Radiation and radiation sources. Ionizing radiation for the treatment of food. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=179.26>.

Chae, M.S. y Schraft, H. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**. **62**: 103-111.

Chen, C. y Durst, R.A. 2006. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* with an array-based immunosorbent assay using universal protein G-liposomal nanovesicles. **Talanta**. **69**: 232-238.

Chen, X.; Jo, C.; Lee, J.I. y Ahn, D.U. 1999. Lipid oxidation, volatiles and color changes of irradiated pork patties as affected by antioxidants. **Journal of Food Science**. **64**: 16-19.

Chirinos, R.R.O.; Vizeu, D.M.; Destro, M.T.; Franco, B.D.G.M. y Landgraf, M. 2002. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers by gamma irradiation. **Brazilian Journal of Microbiology**. **33**: 53-56.

Christensen, Z.T.; Ogden, L.V.; Dunn, M.L. y Eggett, D.L. 2006. Multiple comparison procedures for analysis of ranked data. **Journal of Food Science**. **71**: 132-143.

Christopher, F.M.; Siedeman, S.C.; Carpenter, Z.L.; Smith, O.C. y Vanderzant, C. 1979. Microbiology of beef packaged in various gas atmospheres. **Journal of Food Protection**. **42**: 240-244.

Chung, H.W.; Hong, J.H.; Kim, M.C.; Marshall, M.R.; Jeong, Y. y Han, S.B. 2004. Detection properties of irradiated ostrich meat by DNA Comet assay and radiation-induced hydrocarbons. **Journal of Food Science**. **69**: 399-403.

Church, J.J. y Parsons, A.L. 1995. Modified atmosphere packaging technology- a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. **67**: 143-52.

Cia, G. y Marsh, B.B. 1976. Properties of beef cooked before rigor onset. **Journal of Food Science**. **41**: 1259-1262.

CIE, 1971. Colorimetry: Official recommendations of the International Commission on Illumination. Publication CIE N°15 (E-1.3.1). Bureau Central de la CIE, Paris, Francia.

Clark, D.S. y Lentz, C.P. 1969. The effect of carbon dioxide on the growth of slime-producing bacteria on fresh beef. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. 2:** 72-75.

Clark D.S. y Lentz, C.P. 1973. Use of mixtures of carbon dioxide and oxygen for extending shelf-life of pre-packaged fresh beef. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. 6:** 194-196.

Clark, D.S. y Takacs, J. 1983. Los gases como conservadores. En “Ecología Microbiana de los Alimentos”. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Ed. Acribia. Zaragoza.

Clavero, M.R.S.; Monk, J.D.; Beuchat, L.R.; Doyle, M.P. y Brackett, R.E. 1994. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonellae* and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef gamma irradiation. **Applied and Environmental Microbiology. 60:** 2069-2075.

Cleland, M.R. 2006. Advances in gamma ray, electron beam, and X-ray technologies for food irradiation. En “Food Irradiation Research and Technologies”. C.H. Sommers y X. Fan (eds.), págs. 11-35. Blackwell Publishing. Oxford. ISBN: 978 0813808826.

Codex Alimentarius. 1983. General standard for Irradiated Foods. General standard for irradiated foods. Codex Stan 106-1983, págs. 1-3. Rev.1-2003. 1. SCOPE.

Cordoba, J.J. 2011. Subproyecto Detrapat: incidencia, prevalencia y detección de patógenos por técnicas rápidas en la industria cárnica y productos cárnicos RTE. En “Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables”. J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba y J. Ventanas (eds.), págs. 33-39. Universidad de Extremadura. Cáceres.

Coyne, F.P. 1932. The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. Part I. **Journal of the Society of Chemical Industry. 51:** 119-121.

Crawford, L.M. y Ruff. E.H. 1996. Are view of the safety of cold pasteurization through irradiation. **Food Control**. **7**: 87-97.

Cross, H.R.; Durland, P.R. y Seideman, S.C. 1986. Sensory Qualities of Meat. En "Muscle as Food. Food Science and Technology Series". P.J. Bechtel (ed.), págs. 279-320. Academic Press. New York.

Dainty R.H.; Shaw, B.G.; Harding, C.D. y Michanie, S. 1979. The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. En "Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment". A.D. Russell y R. Fuller (eds.), págs. 83-100. Academic Press. London.

Dainty R.H.; Shaw, B.G. y Roberts, T.A. 1983. Microbial and chemical changes in chill-stored red meats. En "Food Microbiology: Advances and Prospects". T.A. Roberts y F.A. Skinner (eds.), págs. 151-178. Academic Press. London.

Dainty, R.H. y Hofman, F.J.K. 1983. The influence of glucose concentration and culture incubation time on end-product formation during aerobic growth of *Brochothrix thermosphacta*. **Journal of Applied Bacteriology**. **55**: 233-239.

Dainty, R.H. y Hibbard, C.M. 1983. Precursors of the major end products of aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta*. **Journal of Applied Bacteriology**. **55**: 127-133.

Dainty, R.H. y Mackey, B.M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal of Applied Bacteriology**. **73**: 103S-104S.

Dainty, R.H.; Hibbard, C.M. y Edwards, R.A. 1984. Cellular fatty acids of *Streptobacteria* isolated from vacuum packaged meats. **Systematic and Applied Microbiology**. **5**: 233-240.

Daniels, J.; Krishnamurthi, R. y Rizvi, S. 1985. A Review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. **Journal of Food Protection**. **48**: 532-537.

Davidson C.M.; Dowdell, M.J. y Board, R.G. 1973. Properties of gram negative aerobes isolated from meats. **Journal of Food Science**. **38**: 303-305.

Davis, K.J.; Sebranek, J.G.; Huff-Lonergan, E. y Lonergan, S.M. 2004. The effects of aging on moisture-enhanced pork loins. **Meat Science**. **66**: 519-524.

De Pablo, B.; Asensio, M.A.; Sanz, B. y Ordóñez, J.A. 1989. The D (-) Lactic acid and acetoin/diacetyl as potential indicators of the microbial quality of vacuum-packed pork and meat products. **Journal of Applied Bacteriology**. **66**: 185-190.

Delincée, H. 1983. Recent advances in radiation chemistry of proteins. En “Recent advances in food irradiation”. P.S. Elias y A.J. Cohen (eds.), págs. 129-147. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

Dickson, 2004. Inactivación de microorganismos por radiación. En “Irradiación de Alimentos: principios y aplicaciones”. R.A. Molins (ed.), págs. 21-33. Ed. Acribia. Zaragoza.

Diehl, J.F. 1990. Chemical effects of ionizing radiation. En “Safety of irradiated Foods”. O. Fennema, G. Sanderson, P. Walstra, M. Karel, S. Tannenbaum y J. Whitaker (eds.), págs. 66-67. Marcel Dekker. New York and Basel. ISBN: 9780824781378.

Diehl, J.F. 1995. The safety of irradiated food, 2ª ed., Marcel Dekker. Basel.

Diehl, J.F.; Hasselman, C. y Kilcast, D. 1991. Regulation of food irradiation in the European Community: is nutrition an issue? **Food Control**. **2**: 212-219.

Dijkstra, R.G. 1982. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**. **176**: 202-205.

Directiva 86/355/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas, de 21 de julio de 1986, por la que se modifica la Directiva 79/117 JCEE relativa a la prohibición de comercialización y utilización de productos fitofarmacéuticos que contengan determinadas sustancias activas. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas**, de 2 de agosto. **212**: 33-34.

Directiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de febrero de 1999, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre

alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas**, de 13 de marzo de 1999. **66**: 16-23.

Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de febrero de 1999, relativa al establecimiento de una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas**, de 13 de marzo de 1999. **66**: 24-25.

Dixon, N. y Kell, D. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms: a review. **Journal of Applied Bacteriology**. **67**: 109-136.

Dogan, A.; Siyakus, G. y Severcan, F. 2007. FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana* L.). **Food Chemistry**. **100**: 1106-1114.

Doyle, M.E. 1999. Literature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention. Ultraviolet light. FRI Briefings. Madison: University of Wisconsin.

Dransfield, E.; Nute, G.R. y Francombe, M.A. 1984. Comparison of eating quality of bull and steer beef. **Animal Production**. **39**: 37-50.

Dransfield, E. y Rhodes, D.N. 1975. Texture of beef *M. semitendinosus* heated before, during and after development of rigor mortis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. **26**: 483-491.

Du, M.; Ahn, D.U.; Mendonca, A.F. y Wesley, I.V. 2002. Quality characteristics of irradiated ready-to-eat breast rolls from turkeys fed conjugated linoleic acid. **Poultry Science**. **81**: 1378-1384.

Dugan, L.R. 1976. Lipids. VIII. Effects of processing on functional properties and nutritive value. En "Principles of Food Science. Part I. Food chemistry". O.R. Fennema (ed.), págs. 198-200. Marcel Dekker Inc. New York.

Edwards, R.A.; Dainty, R.H.; Hibbard, C.M. y Ramantanis, S.V. 1987. Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**. **63**: 427-434.

EFSA (European Food Safety Authority). 2011a. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the efficacy and microbiological safety of irradiation of food. **The EFSA Journal. 9:** 2103 (88 pp.)

EFSA (European Food Safety Authority). 2011b. Scientific Opinion on the chemical safety of irradiation of food. **The EFSA Journal. 9:** 1930 (57 pp.)

EFSA (European Food Safety Authority). 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **The EFSA Journal. 11:** 3129-3379.

EFSA (European Food Safety Authority). 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **The EFSA Journal. 13:** 1-165.

El-Niely, H.F.G. 2007. Effect of radiation processing on antinutrients, in-vitro protein digestibility and protein efficiency ratio bioassay of legume seeds. **Radiation Physics and Chemistry. 76:** 1050-1057.

El-Shenawy, M.A.; Yousef, A.E. y Marth, E.H. 1989. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in broth or in raw ground beef. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. 22:** 387-390.

El-Zawahry, Y.A. y Rowley, D.B. 1979. Radiation resistance and injury of *Yersinia enterocolitica*. **Applied and Environmental Microbiology. 37:** 50-54.

Ellegner, R.H. 1972. Phosphates in food processing. En "Handbook of food additives". T.E. Furia (ed.), págs. 617-780. CRC Press, Cleveland.

Erdman, I.E.; Thatcher, F.S. y McQueen, K.F. 1961. Studies on the irradiation of microorganisms in relation to food preservation. I. The comparative sensitivities of specific bacteria of public health significance. **Canadian Journal of Microbiology. 7:** 199-205.

Erichsen, I. y Molin, G. 1981. Microbial flora of normal and high pH beef stored at 4 °C in different gas environments. **Journal of Food Protection. 44:** 866-869.

Fan, X. 2003. Ionizing radiation induces formation of malondialdehyde, formaldehyde, and acetaldehyde from carbohydrates and organic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **51**: 5946-5949.

Fan, X. 2005. Formation of furan from carbohydrates and ascorbic acid following exposure to ionizing radiation and thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **53**: 7826-7831.

Fan, X.T. y Sommers, C.H. 2006. Effect of gamma radiation on furan formation in ready-to-eat products and their ingredients. **Journal of Food Science**. **71**: 407-412.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2007. Producción y Sanidad Animal. Manual. Buenas prácticas para la industria de la carne. Fundación Internacional Carrefour. Roma, 2007. ISBN 878-92-5-305146-5.

WHO. 1981. Wholesomeness of irradiated foods. Report of a joint FAO/IAEA/WHO expert committee. WHO Technical Report, Series 659, World Health Organization, Geneva, pp. 9-33.

Farber, J.M.; Coates, F. y Daley, E. 1992. Minimum water activity requeriments for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**. **15**: 103-105.

Farber, J.M.; D'Aoust, J.Y.; Diotte, M.; Sewell, A. y Daley, E. 1998. Survival of *Listeria* spp. on raw whole chickens cooked in microwave ovens. **Journal of Food Protection**. **61**: 1465-1469.

Farber, J.M. y Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**. **55**: 476-511.

Farber, J.M. y Peterkin, P.I. 1999. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. En "*Listeria*, Listeriosis, and Food Safety", 2ª ed. E.T. Ryser y E.H. Marth (eds.), págs. 505-564. Marcel Dekker, Inc., New York.

Farkas, J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food. A review. **International Journal of Food Microbiology**. **44**: 189-204.

Farkas, J. 2006. Irradiation for better foods. **Trends in Food Science and Technology**. **17**: 148-152.

Farkas, J.; Andrassy, E.; Mészáros, L.; Polyák-Fehér Beczner, J.; Gaál, O.; Lebovics, V.K. y Lugasi, A. 2009. Effects of gamma irradiation on lipid and cholesterol oxidation in mechanically deboned turkey meat. Part II. En “Irradiation to ensure the safety and quality of prepared meals”. Results of the Coordinated Research Project organised by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (2002-2006), págs. 95-102. Vienna.

Faustmann, C. y Cassens, R.G. 1990. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. **Journal of Muscle Food**. **1**: 217-243.

FDA (Food and Drug Administration). 1999. Food Code. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Food and Drug Administration. Washington, DC 20204.

FDA (Food and Drug Administration). 2001. US FDA/CFSAN. Guidance for industry control of *Listeria monocytogenes* in refrigerated, ready-to-eat foods. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition.

FDA (Food and Drug Administration). 2003. Food Safety and Inspection Service. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Docket No. 1999N-1168, Vols. 23-28.

FDA (Food and Drug Administration). 2012. Irradiation in the Production, Processing and Handling of Food. Code of Federal Regulations, Title 21, Section 179, págs. 71312-71315.

Fellows, P. 2000. Food processing technology: principles and practice. CRC Press. New York.

Fenlon, D.R. 1986. Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. **Veterinary Record**. **118**: 240-242.

Fennema, O.R.; Damodaran, S. y Parkin, K.L. Fennema. 2010. Química de los Alimentos, 3ª ed. Acribia, Zaragoza. ISBN 978-84-200-1142-4.

FIAB (Federación de Industrias de Alimentación y Bebidas). 2015. Industria alimentaria. Consultado en octubre de 2014 en: <http://www.fiab.es/es/industria/industria.asp>

Flad, R.; Zhu, J.; Wang, C.; Chen, P.; von Falkenhausen, L.; Sun, Z. y Li, S. 2005. Archaeological and chemical evidence for early salt production in China. **The National Academy of Science of the United States of America**. **102**: 12618-12622.

Fleming, D.W.; Cochi, S.L.; MacDonald, K.L.; Brondum, L.; Hayes, P.S.; Plikaytis, B.D.; Holmes, M.B.; Audurier, A.; Broome, C.V. y Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**. **312**: 404-407.

Flores, J. y Nieto, P. 1985. Composición y características de los lípidos de los tejidos adiposo y muscular del cerdo. **Revista de agroquímica y tecnología de alimentos**. **25**: 305-315.

Folch J.; Lees M. y Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**. **226**: 497-509.

Fox, J.B.; Thayer, D.W.; Jenkins, R.K.; Phillips, J.G.; Ackerman, S.A.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Morrow, F.D. y Quirbach, D.M. 1989. Effect of gamma-irradiation on the B-vitamins of pork chops and chicken breasts. **International Journal of Radiation Biology**. **55**: 689-703.

Franklin, S.G. y Mettrione, R.M. 1972. Chromatographic evidence for the existence of multiple forms of cathepsin B1. **Biochemical Journal**. **127**: 207-213.

Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. 1985. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.

Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. 1988. Preservation by radiation. Capítulo 10. En "Food Microbiology". 4ª ed. McGraw-Hill. New York.

Frejaville, C.M. y Saintlebe, L.R. 1981. Radio-induced products in maize starch - glyceraldehyde, dihydroxyacetone, and 2-hydroxymalonaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **29**: 548-550.

Fricker, C.R. y Park, R.W.A. 1989. A two-year study of the distribution of “thermophilic” campylobacters in human, environmental and food samples from the Reading area with particular reference to toxin production and heat-stable serotype. **Journal of Applied Bacteriology**. **66**: 477-490.

Fricker, C.R. y Tompsett, S. 1989. *Aeromonas* spp. In foods: a significant cause of food poisoning? **International Journal of Food Microbiology**. **9**: 17-23.

Fu, A.H.; Sebranek, J.G. y Murano, E.A. 1995. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* and quality attributes of cooked pork chops and cured ham after irradiation. **Journal of Food Science**. **60**: 1001-1005.

Gandemer, G. 1992. Les lipids de la viande: vers une estimation precise de leurs pports nutritionels dans l'alimentation de l'homme. Les Cahiers de l'ENS. **BANA**. **8**: 25-48.

Gann, G.L. y Merkel, R.A. 1978. Ultrastructural changes in bovine *Longissimus* muscle during *postmortem* ageing. **Meat Science**. **2**: 129-144.

García, G. 2013. La industria cárnica española y su fortalecimiento por las investigaciones de CARNISENUSA. CAPITULO I. En “Avances en la producción de elaborados cárnicos seguros y saludables”. J.A. Ordóñez, F. Jiménez y J. Arnau (eds.), págs. 13-18. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Barcelona.

Garcia-Marquez, I.; Cambero, M.I.; Ordonez, J.A.; Cabeza, M.C. 2012a. Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E beam treatment. **Journal of Food Protection**. **75**: 2179-2189.

García-Márquez, I.; Ordóñez, J.A.; Cambero, M.I. y Cabeza, M.C. 2012b. Use of e-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin. **International journal of microbiology**. 962846. DOI: 10.1155/2012/962846

Gardner, G.A.; Carson, A.W. y Patton, J. 1967. Bacteriology of pre-packed pork with reference to gas composition within the pork. **Journal of Applied Bacteriology**. **30**: 321-333.

Garrec, N.; Picard-Bonnaud, F. y Poucher A.M. 2003. Occurrence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. **Medical Microbiology**. **35**: 275-283.

Genigeorgis, C.A. 1985. Microbial and safety implications of the use of modified atmosphere to extend the storage life of fresh meat and fish. **International Journal of Food Microbiology**. **5**: 237-251.

Georgala, D.L. y Davidson, C.M. 1970. Food Package. Patente británica nº1. 199.998.

George, P. y Stratmann, C.J. 1952. The oxidation of myoglobin to metmyoglobin by oxygen. 2. The relation between the first order rate constant and the partial pressure of oxygen. **Biochemical Journal**. **51**: 418-425.

Giannuzzi, L. y Zaritzky, N.E. 1996. Effect of ascorbic acid in comparison to citric and lactic acid on *Listeria monocytogenes*. Inhibition at refrigeration temperatures. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technology**. **29**: 278-285.

Giddings, G.G. 1974. CRC. Reduction of ferrimyoglobin in meat. Critical Review. **Food Technology**. **5**: 143-173.

Gilbert, R.J.; Mileer, K.L. y Roberts, D. 1989. *Listeria monocytogenes* and chilled foods. **Lanceti**. **1**: 383-384.

Gill, A.O. y Gill, C.O. 2005. Preservative packaging for fresh meats, poultry, and fin fish. En "Innovations in food packaging". J.H. Han (ed.), págs. 204-226. Elsevier Academic Press. Amsterdam.

Gill, C.O. 1979. Intrinsic bacteria in meat. **Journal of Applied Bacteriology**. **47**: 367-378.

Gill, C.O. 1986. The microbiology of chilled meat storage. En "Proceedings of the 24th Meat Industry Research Conference". Mirinz publication. 852: 210-213. Hamilton.

Gill, C.O. y Harrison, J.C.L. 1989. The storage life of chilled pork packaged under carbon dioxide. **Meat Science**. **26**: 313-324.

Gill, C.O. y Newton, K.G. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperature. **Journal of Applied Bacteriology**. **43**: 189-195.

Gill, C.O. y Tan, K.H. 1980. Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. **39**: 317-319.

Giroux, M.; Ouattara, B.; Yefsah, R.; Smoragiewicz, W.; Saucier, L. y Lacroix, M. 2001. Combined effect of ascorbic acid and gamma irradiation on microbial and sensorial characteristics of beef patties during refrigerated storage. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. **49**: 919-925.

Gispert, M. y Diestre, A. 1999. Consideraciones sobre la clasificación de canales porcinas en España. En “Jornada técnica: Factores que afectan a la eficiencia productiva y la calidad en porcino”. Ed. IRTA. Vic, Barcelona.

Glaser, R. y Kiecolt-Glaser, J.K. 2005. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nature Reviews Immunology**. **5**: 243-251.

Glass, K. y Doyle, M.P. 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. **Applied and Environmental Microbiology**. **55**: 1565-1569.

Godber, J.S. 1994. Nutritional Value of Muscle Foods. En “Muscle Foods. Meat Poultry and Seafood Technology”. D.M. Kinsman, A.W. Kotula y B.C. Breidenstein (eds.). Chapman y Hall, New York.

Gorris, L.G.M. 2005. Food safety objective: An integral part of food chain management. **Food Control**. **16**: 801-809.

Gould, G.W. 1989. Drying, Raised Osmotic Pressure and Low Water Activity. En “Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures”. G.W. Gould (eds.), pág. 97. Unilever Research Laboratory, Sharnbrook, Bedford.

Goulet, V.; Lepoutre, A.; Rocourt, J.; Courtieu, A.L.; Dehaumont, P. y Veit, P. 1993. Epidémie de listériose en France: Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. **Bulletin épidémiologique hebdomadaire**. 13-14.

Grant, I.R. y Patterson, M.F. 1992. Sensitivity of foodborne pathogens to irradiation in the components of a chilled ready meal. **Food Microbiology**. **9**: 95-103.

Grant, I.R. y Patterson, M.F. 1995. Combined effect of gamma radiation and heating on the destruction of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimorium* in cook-chill roast beef and gravy. **International Journal of Food Microbiology**. **27**: 117-128.

Grau, R. y Hamm, R. 1953. Eine einfache methode zur bestimmung der wasserbindung im muskel. **Die Naturwissenschaften**. **40**: 29-30.

Gray, M.L. 1963. Epidemiological aspects of listeriosis. **American Journal of Public Health and the Nations Health**. **53**: 554-563.

Grecz, N.; Rowley, D.B. y Matsuyama, A. 1983. The action of radiation on bacteria and viruses. En "Preservation of Foods by Ionizing Radiation", vol. 2. E.S. Josephson y M.S. Peterson (eds.), págs. 167-218. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Green, S.S. 1990. *Listeria monocytogenes* in meat and poultry products. Interium Rept. to National Advisory Committee on Microbiological Specifications for Foods. FSIS/ USDA, Nov. 27.

Greer, G.C. 1989. Red meats, poultry and fish. En "Enzymes of psychrotrophs in raw food". R.C. McKellar (eds.), págs. 268-292. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Gursel, B. y Gurakan, G.C. 1997. Effects of gamma irradiation on the survival of *Listeria monocytogenes* and on its growth at refrigeration temperature in poultry and red meat. **Poultry Science**. **76**: 1661-1664.

Hagler, L.; Coppes, R.I. y Hernan, R.H. 1979. Metmyoglobin reductase. Identification and purification of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from bovine heart which reduces metmyoglobin. **Journal of Biological Chemistry**. **254**: 6505-6514.

Haines, R.B. 1933. The bacterial flora developing on stored lean meat, especially with regard to "slimy" meat. **Journal of Hygiene.** **33**: 175-82.

Hashisaka, A.E.; Matches, T.R.; Batters, Y.; Hungate, F.P. y Dong, F.M. 1990. Effects of gamma irradiation at -78° C on microbial populations in dairy products. **Journal of Dairy Science.** **55**: 1284-1289.

Hashisaka, A.E.; Weagant, S.D. y Dong, F.M. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation. **Journal of Food Protection.** **52**: 490-492.

Hau, L.B. y Liew, M.S. 1993. Preservation of grass prawns by ionizing radiation. **Journal of Food Protection.** **55**: 198-202.

Hau, L.B.; Liew, M.H. y Yeth, L.T. 1992. Preservation of grass prawns by ionizing radiation. **Journal of Food Protection.** **55**: 198-202.

Hechelmann, H. 1986. Mikrobiel verursachte Fehlfabrikate bei Rohwurst und Rohschinken. **Fleischwirtsch.** **66**: 515-528.

Hein, W.G.; Simat, T.J. y Steinhart, H. 2000. Detection of irradiated food. Determination of non-protein bound o-tyrosine as a marker for the detection of irradiated shrimps. **European Food Research and Technology.** **210**: 299-304.

Hitchener, B.J.; Egan, A.F. y Rogers, P.J. 1979. Energetics of *Microbacterium thermosphactum* in glucose-limited continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology.** **37**: 1047-1052.

Hönikel, K.O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat Science.** **49**: 447-457.

Hönikel, K.O.; Kim, C.J.; Hamm, R. y Roncales, P. 1986. Sarcomere shortening of prerigor muscle and its influence on drip loss. **Meat Science.** **16**: 267-282.

Horstein I.; Crowe, P.F. y Heimberg, M.J. 1961. Fatty acid composition of meat tissue lipids. **Journal of Food Science.** **26**: 581.

de la Hoz, L.; Cambero, I.; Cabeza, M.C.; Herrero, A.M. y Ordóñez, J.A. 2008. Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam irradiation. **Journal of Food Protection**. **71**: 2001-200.

de la Hoz, L.; Cambero, I. y Ordóñez, J.A. 2011. Subproyecto Procarte: uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de productos cárnicos listos para el consumo (RTE). En “Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables”. J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba y J. Ventanas (eds.). Universidad de Extremadura. Cáceres.

Huhtanen, C.N.; Jenkins, R.K. y Thayer, D.W. 1989. Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. **52**: 610-613.

ICEX (Instituto Español de Comercio Exterior). 2015. Estadísticas españolas de comercio exterior. Ministerio de Economía y Competitividad. Disponible en: <http://www.icex.es/icex/es/navegacion-principal/todos-nuestros-servicios/informacion-de-mercados/estadisticas/sus-estadisticas-a-medida/estadisticas-espanolas-estacom/index.html>. Consultado en octubre de 2015.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 1996a. Características de los patógenos microbianos. ”En “Microbiología de los Alimentos”. Págs. 165-175. Ed. Acribia. Zaragoza.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 1996b. En “Microorganisms in foods 5”. Microbiological specifications of food pathogens. Págs. 299-333. Chapman & Hall. Londres.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 1996c. Characteristics of Microbial Pathogens. En “Microorganisms in Food 5”. Blackie Academic and Professional, Aspen Publishers, Inc. Maryland.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 2002. Microbiological testing in food safety management. En “Microorganisms in foods 7”, págs. 313-332. Kluwer Academic Plenum Publishers & Hall. New York.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 2004. Microorganismos de los alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria. Acribia. Zaragoza.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 2005. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. 2ª ed. Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 2007. Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Foods Safety Management, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Springer, New York

IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology). 1983. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 10. **International Journal of Systematic Bacteriology**. **33**: 438-440. doi: 10.1099/00207713-33-2-438

Informe Industria Alimentaria en 2012-2013. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/INFORME_INDUSTRIA_ALIMENTARIA_2012-2013_tcm7-8208.pdf

Ingram, M. 1962. Microbiological principles in prepacking meats. **Journal of Applied Bacteriology**. **25**: 259-281.

Ingram, M. y Dainty, R.H. 1971. Changes caused by microbes in spoilage of meats. **Journal of Applied Bacteriology**. **34**: 21-39.

Inoue, M.; Kishimoto, A.; Takai, Y. y Nishizuka, Y. 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. **Journal of Biological Chemistry**. **252**: 7610-7616.

ISO (International Standards Organization). 1981a. Analyze sensorielle. Guide pour l'implantation d'un local destiné aux analyses sensorielles. ISO/DP 66.58. Genève: ISO.

ISO (International Standards Organization). 1981b. Methodologie essai triangulaire. ISO TC 34/SC 12, Genève: ISO.

ISO (International Standards Organization). 1992. Sensory analysis – Vocabulary. ISO 5492, Genève: ISO.

Issanchou, S. 1996. Consumer expectations and perceptions of meat and meat products. **Meat Science**. **43**: S5-S19.

Ito, H.; Shibabe, S. y Iizuka, H. 1973. Effect of gamma-irradiation on the microflora of Thai rice. En “Food Irradiation in the Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment”. JAERI-M 5458, No. 1, págs. 11-15. Tokyo Japan Atomic Energy Research Institute. Tokyo.

Jacket, C.; Catimel, B.; Brosch, R.; Buchrieser, C.; Dehaumont, P.; Goulet, V.; Lepoutre, V. y Rocourt, J. 1995. Investigation related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. **Applied and Environmental Microbiology**. **61**: 2242-2246.

Jackson, T.C.; Marshall, D.L.; Acuff, G.R. y Dickson, J.S. 2001. Meat, poultry and seafood. En “Food Microbiology Fundamentals and Frontiers”, 2ª ed. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville (eds.). ASM Press, Washington DC.

Jay, J.M. 1972. Mechanism and detection of microbial spoilage in meats at low temperatures: A status report. **Journal of Milk and Food Technology**. **35**: 467-470.

Jay, J.M. 2000. Food preservation with modified atmospheres. En “Modern food microbiology”. D.R. Heldman (ed.), págs. 283-295. Aspen Publishers, Inc. Frederick, MD.

Jay, J.M.; Loessner, M.J. y Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7ª ed. Springer. New York.

Jay, J.M.; Loessner, M.J. y Golden, D.A. 2009. Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.

Jaye M., Kittaka, R.S. y Ordal, Z.J. 1962. The effect of temperature and packaging material on the storage life and bacterial flora of ground beef. **Food Technology**. **16**: 95-98.

Joanes, D.N. 1985. On a rank sum test due to Kramer. **Journal of Food Science**. **50**: 1442-1444.

Johnson, B.Y. 1974. Chilled vacuum-packed beef. CSIRO. **Food Research Quarterly**. **34**: 14-21.

Johnston, A.M. 2000. HACCP and farm production. En "The meat industry". M. Brown (ed.), págs. 37-80. Woodhead Publishing Limited. Cambridge.

Jones, J.L.; Dargelas, V.; Roberts, J.; Press, C.; Remington, J.S. y Montoya, J.G. 2009. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, **49**: 878-884.

Jones, S.L.; Carr, R. y McKeith, F.K. 1987. Palatability and storage characteristics of precooked pork roast. **Journal of Food Science**. **52**: 279-281.

Josephson, E.S.; Thomas, M.H. y Calhoun, W.K. 1978. Nutritional aspects of food irradiation: an overview. **Journal of Food processing and preservation**. **2**: 299-313.

Jowitt, R. 1974. The terminology of food texture. **Journal of Texture Study**. **5**: 351-358.

Kaczmarek, E.B. y Jones, D.M. 1989. Listeriosis and ready cooked chicken. **Lancet**. **1**: 549-552.

Kampelmacher, E.H. 1983. Irradiation for control of *Salmonella* and other pathogens in poultry and fresh meats. **Food Technology**. **37**: 117-119.

Kauffman, R.G.; van Laack R.L.; Russell, R.L.; Pospiech, E.; Cornelius, C.A.; Suckow, C.E. y Greaser, M.L. 1998. Can pale, soft, exudative pork be prevented by *postmortem* sodium bicarbonate injection? **Journal of Animal Science**. **76**: 3010-3015.

Kerr, K.G.; Dealler, S.F. y Lacey, R.W. 1988. *Listeria* ion cook-chill foods. **Lancet**. **2**: 37-38.

Khayat, A. y Schwal, D. 1983. Lipids oxidation on seafood. **Food Tecnology**. **37**: 130-140.

Kilcast, D. 1994. Effect of irradiation on vitamins. **Food Chemistry**. **49**: 157-164.

Kim, Y.M.; Paik, H.D. y Lee, D.S. 2002. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocins-coated plastic packaging film. **Journal of the Science of Food and Agriculture. 82:** 998-1002.

King A.D. y Nagel, C.W. 1967. Growth inhibition of a *Pseudomonas* by carbon dioxide. **Journal of Food Science. 32:** 575-579.

Kittson, E. 1992. A case cluster of listeriosis in Western Australia with links to paté consumption. Proceedings of the 11th international symposium on the problem of listeriosis. Págs. 39-40. Copenhagen.

Koohmaraie, M. y Geesink, G.H. 2006. Contribution of *postmortem* muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science. 74:** 34-43.

Koohmaraie, M.; Kent, P.M.; Shackelford, S.D.; Veiseth, E. y Wheeler, T.L. 2002. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science. 62:** 345-352.

Kraft, A.A. 1986. Psychrotrophic organism. En “Advances in Meat Research” Vol 2. Meat and poultry microbiology. A.M. Pearson y T.R. Dutson (eds.), págs. 191-208. Ed. AVI Publishing, Westport C.T.

Kraft, A.A. 1992. Psychrotrophic spoilage bacteria. Meat spoilage, En “Psychrotrophic bacteria in food research and spoilage”. A.A. Kraff (ed.), págs. 28-61. Ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Kramer, A. 1964. Definition of texture and its measurement in vegetable products. **Food Technology. 18:** 304.

Krause, R.J.; Ockerman, H.W.; Krol, B.; Moerman, P.C. y Plimpton, J.R. 1978. Influence of tumbling, tumbling time, trim and sodium tripolyphosphate on quality and yield of cured hams. **Journal of Food Science. 43:** 853-855.

Kritzman, G.; Chet, I. y Henis, Y. 1977. The Role of Oxalic Acid in the Pathogenic Behavior of *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Experimental Mycology. 1:** 280-285.

Kuma, F. e Inomata, H. 1972. Studies on methemoglobin reductase. II. The purification and molecular properties of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent methemoglobin reductase. **Journal of Biological Chemistry**. **247**: 556-60.

Kume, T.; Furuta, M.; Todoriki, S.; Uenoyama, N. y Kobayashi, Y. 2009. Status of food irradiation in the world. **Radiation Physics and Chemistry**. **78**: 222-226.

Kwon, J.K.; Kwon, Y.; Nam, K.C.; Lee, E.J. y Ahn, D.U. 2008. Effect of electron-beam irradiation before and after cooking on the chemical properties of beef, pork, and chicken. **Meat Science**. **80**: 903-909.

Labuza, T.P.; Acott, K.; Tatinl, S.R.; Lee, R.Y.; Flink, J. y McCall, W. 1976. Water activity determination: a collaborative study of different methods. **Journal of Food Science**. **41**: 910-917.

Lacroix, M.; Le, T.C.; Outtara, B.; Yu, H.; Letendre, M.; Sabato, S.F., Mateescu, M.A. y Patterson, G. 2002. Use of γ -irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functional characteristics. **Radiation Physics and Chemistry**. **63**: 827-832.

Lambert, C.A.; Soudant, E.P.; Nusgens, B.V. y Lapière, C.M. 1992. Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. **Laboratory Investigation**. **66**: 444-451.

Lambert, J.D. y Maxcy, R.B. 1984. Effect of gamma radiation on *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Science**. **49**: 665-667.

Lammerding, A.M.; Garcia, M.M.; Mann, E.D.; Robinson, Y.; Dorward, W.J.; Truscott, R.B. y Tittiger, I. 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef and poultry in Canada. **Journal of Food Protection**. **51**: 47-52.

Larson, G.; Dobney, K.; Albarella, U.; Fang, M.; Matisoo-Smith, E.; Robins, J.; Lowden, S.; Finlayson, H.; Brand, T.; Willerslev, E.; Rowley-Conwy, P.; Andersson, L. y Cooper, A. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. **Science**. **307**: 1618-1621.

Lawrence, T.E.; Dikeman, M.E.; Hunt, M.C.; Kastner, C.L. y Johnson, D.E. 2003. Staged injection marination with calcium lactate, phosphate and salt may improve beef water binding ability and palatability traits. **Meat Science**. 967-972.

Lawrie, R.A. 1977. Ciencia de la Carne. Ed. Acribia. Zaragoza.

Lawrie, R.A. 1981. Developments in Meat Science-2. Elsevier Applied Science Publishers, London.

Lawrie, R.A. 1991. Meat Science 5th edition. Pergamon Press. Oxford.

Lawrie R.A. 1998. Glucólisis *postmortem*. En “Ciencia de la carne”, págs. 77-79. Ed. Acribia. Zaragoza.

Lawrie, R.A.; Pomeroy, R.W. y Cuthbertson, A. 1963. Studies on the muscles of meat animals. III. Comparative composition of various muscles in pigs of three weight groups. **Journal of Agricultural Science**. **60**: 195-209.

Lebert, I.; Begot, C. y Lebert, A. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in meat medium as affected by pH (5,8-7,0), water activity (0,97-1,00) and temperature (7-25 degree C). **International journal of systematic bacteriology**. **39**: 53-60.

Ledward, D.A. 1970. Metmyoglobin formation in beef stored in carbon dioxide enriched and oxygen depleted atmospheres. **Journal of Food Science**. **35**: 33-37.

Ledward, D.A. 1971. Metmyoglobin formation in beef muscles as influenced by water content and anatomical location. **Journal of Food Science**. **36**: 138-140.

Ledward, D.A. 1984. En “Developments in Food Proteins-3”. B.J.F. Hudson (ed.). Elsevier Applied Science. Publishers. Londres.

Ledward, D.A.; Smith, C.G.; Clarke, H.M. y Nicholson, M. 1977. Relative role of catalysts and reductants in the formation of metmyoglobin in aerobically stored beef. **Meat Science**. **1**: 149-156.

Lee, E.J. y Ahn, D.U. 2003. Production of volatiles from fatty acids and oils by irradiation. **Journal of Food Science**. **68**: 70-75.

Lee, E.J. y Ahn, D.U. 2005. Quality characteristics of irradiated turkey breast rolls formulated with plum extract. **Meat Science**. **71**: 300-305.

Lee, J.; Kausar, T. y Kwon, J.H. 2008. Characteristic hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones for detecting gamma-irradiated sesame seeds after steaming, roasting, and oil extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **56**: 10391-10395.

Leistner, L. 1992. Food preservation by combined methods. **Food Research International** **25**: 151-158.

Leistner, L. y Rodel, W. 1976a. Inhibition of micro-organisms in food by water activity. En "Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes". F.A. Skinner y W.B. Hugo (eds.), págs. 219-237. Academic, London.

Leistner, L. y Rödel, W. 1976b. The stability of intermediate moisture foods with respect to micro-organisms. En "Intermediate Moisture Foods". R. Davies, G.G. Birch y Parker K.J. (eds.), págs. 120-137. Applied Science Publishers, London.

Lennon, D.; Lewis, B. y Mantell, C. 1984. Epidemic perinatal listeriosis. **Pediatric Infectious Disease Journal**. **3**: 30-34.

Letellie, P. y Nawar, W.W. 1972. 2-alkylcyclobutanones from radiolysis of triglycerides. **Lipids**. **7**: 75-76.

Lewis, N.F. 1971. Studies on a radio-resistant coccus isolated from Bombay Duck (*Harpodon nehereus*). **Journal of general microbiology**. **66**: 29-35.

Ley, F.J. 1983. New interest in the use of irradiation in the food industry. **Society for Applied Bacteriology**. **11**:113-129.

Ley, F.J.; Freeman, B.M. y Hobbs, B.C. 1963. The use of gamma radiation for the elimination of salmonellae from various foods. **Journal of Hygiene**. **61**: 515-529.

Lieber, H. 1905. U.S. Patent 788480.

Linnan, M.; Mascola, L.; Low, X.D.; Goulet, V.; May, S.; Salminen, C.; Hird, D.; Yonekura, L.; Hayes, P.; Weaver, R.; Andurier, A.; Plikaytis, B.D.; Fannin, S.L.; Kleks, A.

y Broome, C.V. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**. **319**: 823-828.

Liu, J.; Stevens, C.; Khan, V.A. y Kabwe, M. 1991. The effect of ultraviolet irradiation on shelf-life and ripening of peaches and apples. **Journal of Food Quality**. **14**: 299-305.

Livingston, M.; Brewer, M.S.; Killifer, J.; Bidner, B. y McKeith, F. 2004. Shelf life characteristics of enhanced modified atmosphere packaged pork. **Meat Science**. **68**: 115-22.

Loaharanu, P. 1995. Food irradiation: current status and future prospects. En "New methods of food preservation". G.W. Gould (ed.), págs. 90-111. Blackie Academic & Professional. Glasgow.

López de Munain, E. 2013. La sal: una roca comestible. Disponible en: zapardiel.org.es

López-Gálvez, D.E.; de la Hoz, L.; Blanco, M. y Ordóñez, J.A. 1998. Refrigerated storage (2 °C) of Sole (*Solea solea*) fillets under CO₂-enriched atmospheres. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **46**: 1143-1149.

Lou, Y. y Yousef, A.H. 1999. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. En "Listeria, listeriosis and food safety". E.T. Ryser y E.H. Marth (eds.), págs. 134-224. Marcel Dekker. New York.

Love, J.D. y Pearson, A.M. 1971. Lipid oxidation in meat and meat products. A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. **48**: 547-555.

Lück, E. 1981. Conservación química de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.

Lücke, F.C. 1986. Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. **Fleishwirtschaft** **66**: 1505-1509.

Maca, J.V.; Miller, R.K.; Bigner, M.E.; Lucia, L.M. y Acuff, G.R. 1999. Sodium lactate and storage temperature effects on shelf life of vacuum packaged beef top rounds. **Meat Science**. **53**: 23-29.

Mackey, B.M. y Bratchell, N. 1989. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**. **9**: 89-94.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2012. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/INFORME_INDUSTRIA_ALIMENTARIA_2012-2013_tcm7-8208.pdf

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2014. Industria alimentaria en 2012-2013. Disponible en: http://www.eurocarne.com/pdf/informes/informe_ind_alimentaria_2012_2013.pdf

Markus, F.; Daood, H.G; Kapitány, J. y Biacs, P.A. 1999. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **47**: 100-107.

Matsuyama, A.; Thornley, M.J. y Ingram, M. 1964. The effect of freezing on the radiation sensitivity of vegetative bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**. **27**: 110-124.

Maxcy, R.B. y Tawari, N.R. 1973. Radiation prevention of foods. International Atomic Energy Agency. Wien.

Maxcy, R.B.; Rowley, D.B. y Anellis, A. 1976. Radiation resistance of asporogenous bacteria in frozen beef. Technical Report. Págs. 76-43. U.S. Army Natick Research and Development Command, Natick. Massachusetts.

Mayer-Miebach, E.; Stahl, M.R.; Eschrig, U.; Deniaud, L.; Ehlermann, D.A.E. y Schuchmann, H.P. 2005. Inactivation of a non-pathogenic strain of *E. coli* by ionizing radiation. **Food Control**. **16**: 701-705.

McClain, P.E.; Creed, G.J.; Wiley, E.R. y Hornstein, I. 1970. Effect of *postmortem* aging on isolation of intramuscular connective tissue. **Journal of Food Science**. **35**: 258-259.

McDougall, D.D. y Taylor, A.A. 1975. Color retention in fresh meat stored in oxygen: a commercial scale trial. **Journal of Food Technology**. **10**: 339-347.

McGee, M.R.; Henry, K.L.; Brooks, J.C.; Ray, F.K. y Morgan, J.B. 2003. Injection of sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and sodium lactate improves the Warner-

Bratzler shear and sensory characteristics of pre-cooked inside round roasts. **Meat Science**. **64**: 273-277.

McGowan, A.P.; Bowker, K.; McLauchlin, J.; Bennett, P.M. y Reeves, D.S. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. **International Journal of Food Microbiology**. **21**: 325-334.

McLauchlin, J.; Hall, S.M.; Velami, S.K. y Gilbert, R.J. 1991. Human listeriosis and pate: a possible association. **British Medical Journal**. **303**: 773-775.

McMeekin, T.A.; Gibbs, P.A. y Patterson, J.T. 1978. Detection of volatile sulfide-producing bacteria isolated from poultry-processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**. **356**: 1216-1218.

McMillin, K.W. 2008. Where is MAP going. A review and the future potential of modified atmospheric packaging for meat. **Meat Science**. **80**: 43-63.

McMillin, K.W.; Huang, N.Y.; Ho, C.P. y Smith, B.S. 1999. Quality and shelf-life of meat in case-ready modified atmosphere packaging. En "Quality attributes in muscle foods". Y.L. Xiong, F. Shahidi y C.T. Ho (eds.), págs. 73-93. ACS Symposium Series, Plenum Publishing Corporation. New York.

Meilgaard, M.C.; Civille, G.V. y Carr, B.T. 1999. Sensory Evaluation Techniques. 3rd Edition. Ed. CRC Press. Boca Ratón, Florida.

Mellerick, D. y Cogan, T.M. 1981. Induction of some enzymes of citrate metabolism in *Leuconostoc lactis* and other heterofermentative lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Research**. **48**: 497-502.

Menaa, C.; Almeidaa, G.; Carneiroa, L.; Teixeraa, P.; Hogga, T. y Gibbsa P.A. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**. **21**: 213-216.

Mendonca, A.F. 2002. Inactivation by irradiation. En "Control of Foodborne Microorganisms". V.K. Juneja y J.N. Sofos (eds.), págs. 75-103. Marcel Dekker Inc. New York.

Merritt, C. Jr.; Angelini, P. y Graham, R.A. 1978. Effect of radiation parameters on the radiolysis products in meat and meat substances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **26**: 29-33.

Meynier, A.; Genot, C. y Gandemer, G. 1998. Volatile compounds of oxidized pork phospholipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. **75**: 1-7.

Miller, A.J. 1992. Combined water activity and solutes effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**. **55**: 414-418.

Miller, M.F.; Carr, M.A.; Ramsey, C.B.; Crockett K.L. y Hoover, L.C. 2001. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. **Journal of Animal Science**. **79**: 3062-3068.

Miller, R.K. 1994. Quality Characteristics. En "Muscle Foods, Meat Poultry and Seafood Technology". D.M. Kinsman, A.W. Kotula y B.C. Breidenstein (eds.). Chapman & Hall.

Minck, F. 1986. Zur Frage über die Einwirkung der Röntgen schen Strahlen auf Bakterien und ihre eventuelle therapeutische Verwendbarkeit. **Munchner Medizinische Wochenschrift**. **5**: 101-102.

Molin, G. y Terström, A. 1982. Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. **Journal of general microbiology**. **128**: 1249-1264.

Molin, G. y Terström, A. 1986. Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water and soil. **International journal of systematic bacteriology**. **36**: 257-274.

Molin, G.; Ternström, A. y Ursing, J. 1986. *Pseudomonas ludensis*, a new bacterial species isolated from meat. **International journal of systematic bacteriology**. **36**: 339-342.

Monk, J.D.; Beuchat, L.R. y Doyle, M.P. 1995. Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. **Journal of Food Protection**. **58**: 197-208.

Montville, T.J. y Matthews, K.R. 2005. Food Microbiology. An Introduction, 2ª ed. ASM Press. Washington D.C.

Morehouse, K.M. y Ku, Y. 1993. Identification of irradiated foods by monitoring radiolytically produced hydrocarbons. **Radiation Physics and Chemistry. 42:** 359-362.

Moreiras, O.; Carbajal, A. y Cabrera, L. 1995. Tablas de Composición de Alimentos. Ed. Pirámide. Madrid.

Moseley, B.E.B. 1967. The isolation and some properties of radiation-sensitive mutants of *Micrococcus radiodurans*. **Journal of General Microbiology. 49:** 293-300.

Mourot, J. y Hermier, D. 2001. Lipids in monogastric animal meat. **Reproduction Nutrition Development. 41:** 109-118.

Moy, J.H. 2005. Tropical fruit irradiation. From research to commercial application. En "International symposium: New frontier of irradiated food and non-food products". 22-23 September 2005, KMUTT: Bangkok, Thailand.

Murano, P.S.; Murano, E.A. y Olson, D.G. 1995. Quality characteristics and sensory evaluation of ground beef irradiated under various packaging atmospheres International Congress of Meat Science and Technology. San Antonio. Texas.

Murphy, R.Y.; Duncan, L.K.; Johnson, E.R.; Davis, M.D. y Marcy, J.A. 2002. Thermal inactivation of *Salmonella* Senftenberg and *Listeria innocua* in beef/turkey blended patties cooked via fryer and/or air convection oven. **Journal of Food Science. 67:** 1879-1885.

Murray, E.G.D.; Webb, R.A. y Swarm, M.B.R. 1926. A disease in rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). **Journal of Pathology and Bacteriology. 29:** 407-439.

Nakamura, M. y Schulza, J.A. 1970. *Clostridium perfringens* food poisoning. **Annual Review of Microbiology. 24:** 359-372.

Nam, K.C. y Ahn, D.U. 2002. Effect of double-packaging and acid combination on the quality of irradiated raw turkey patties. **Journal of Food Science. 67:** 3252-3257.

Nam, K.C. y Ahn, D.U. 2003a. Double-packaging is effective in reducing lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated raw Turkey meat. **Poultry Science**. **82**: 1468-1474.

Nam, K.C. y Ahn, D.U. 2003b. Combination of aerobic and vacuum packaging to control color, lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated raw turkey breast. **Meat Science**. **63**: 389-95.

Nam, K.C.; Du, M.; Jo, C. y Ahn, D.U. 2001. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. **Meat Science**. **58**: 431-435.

Nam, K.C.; Kim, Y.H.; Du, M. y Ahn, D.U. 2002. Off-odor volatiles and pink color development in precooked, irradiated turkey breast during frozen storage. **Poultry Science**. **81**: 269-275.

Nam, K.C.; Ko, K.Y.; Min, B.R.; Ismail, H.; Lee, E.J.; Cordray, J. y Ahn, D.U. 2006. Influence of rosemary–tocopherol/ packaging combination on meat quality and the survival of pathogens in restructured irradiated pork loins. **Meat Science**. **74**: 380-387.

Nam, K.C.; Min, B.R.; Park, K.S.; Lee, S.C. y Ahn, D.U. 2003. Effects of ascorbic acid and antioxidants on the lipid oxidation and volatiles of irradiated beef patties. **Journal of Food Science**. **68**: 1680-1685.

Nanke, K.E.; Sebranck, J.G. y Olson, D.G. 1998. Color characteristics of irradiated vacuum-packaged pork, beef and turkey. **Journal of Food Science**. **63**: 1001-1006.

Narváez-Rivas, M.; Gallardo, M.; Ríos, J.J. y León-Camacho, M. 2011. A new high-performance liquid scattering detector for the analysis of phospholipids. Application to Iberian pig subcutaneous fat. **Journal of Chromatography A**. **1218**: 3453-3458.

Narváez-Rivas, M.; Pham, A.J.; Schilling, M.W. y León-Camacho, M. 2014. A new SPE/GC-fid Method for the determination products. Application to sub-cured ham. **Talanta**. **122**: 58-62.

Narváez-Rivas, M.; Vicario, I.M. y León-Camacho, M. 2010. Volatile hydrocarbon profile of Iberian dry-cured hams. A possible tool for authentication of hams according to the fattening diet. **Talanta**. **81**: 1224-1228.

Narvaiz, P. 2006. Método de control. En “Enfasis Alimentaria”. Editorial FLC. Año XII, N° 2. Abril-mayo 2006.

Nawar, W.W.; Zhu R. y Yoo, Y.J. 1990. Radiolytic products of lipids as markers for the detection of irradiated foods. En “Food irradiation and the chemistry”. D.E. Johnston y M.H. Stevenson (eds.), págs. 13-24. Special Publication 86, Royal Society of Chemistry. Cambridge.

Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Picariello, G.; Coppola, R.; Reale, A. y Di Luccia, A. 2007. Evaluation of gamma rays influence on some biochemical and microbiological aspects in black truffles. **Food Chemistry. 103:** 344-354.

Newton, K.G.; Harrison, J.C.L. y Smith, K.M. 1977. The effect of storage in various gaseous atmospheres on the microflora of lamb chops held at 1 °C. **Journal of Applied Bacteriology. 43:** 53-60.

Niven, C.F. Jr. 1958. Microbiological aspects of radiation preservation of food. **Annual Review of Microbiology. 12:** 507-524.

NLSBM, 1988. Fatty acids in foods and their health implications, 2nd Edition. Ching Kuang Chow (ed.). University of Kentucky. Lexington, Kentucky. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel.

Notermans, S.; Dufrenne, J.; Teunis, P. y Chackraborty, T. 1998. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection. 61:** 244-248.

Nottingham, P.M. 1982. En “Meat Microbiology”. M.H. Brown (ed.). Applied Science Publishers. Londres.

O'Bryan, C.A.; Crandall, P.G.; Ricke, S.C. y Olson, D.G. 2008. Impact of irradiation on the safety and quality of poultry and meat products: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 48:** 442-457.

Obana, H.; Furuta, M. y Tanaka, Y. 2006. Detection of 2-alkylcyclobutanones in irradiated meat, poultry and egg after cooking. **Journal of Health Science. 52:** 375-382.

O'Connor, P.L.; Brewer M.S.; McKeith, F.K.; Novakofski, J.E. y Carr, T.R. 1993. Sodium lactate/sodium chloride effects on sensory characteristics and shelf-life of fresh ground pork. **Journal of Food Science**. **58**: 978-980.

Offer, G. y Knight, P. 1988. The structural basis of water-holding in meat; Part 2: Drip Losses. En "Developments in Meat Science 4". R. Lawrie (ed.), págs. 173-241. Elsevier, Oxford.

Offer, G. y Trinick, J. 1983. On the mechanism of water holding in meat and the swelling and shrinking of myofibrils. **Meat Science**. **8**: 245-281.

Ogilvy, W.S. y Ayres, J.C. 1951. *Post-mortem* changes in meats II. The effects of atmospheres containing carbon dioxide in prolonging the storage life of cuo-up chicken. **Food Technology**. **5**: 97-102.

Ogilvy, W.S. y Ayres, J.C. 1953. *Post-mortem* changes in stored meat. V. Effect of carbon dioxide on microbial growth on stored frankfurters and characteristics of some microorganisms isolated from them. **Food Research**. **18**: 121-130.

Ohlsson, T.; Gothenburg, T. y Bengtsson, N. 2002. Minimal processing of foods with non-thermal methods. En "Minimal processing technologies in the food industry". T. Ohlsson, y N. Bengtsson, (eds.), págs. 34-60. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cambridge. ISBN: 9780849314544.

Olson, D.G. 1998. Irradiation of food: Scientific status summary. **Food Technology**. **52**: 56-62.

Olson, J.C. y Mocquot, M. 1980. Milk and milk products. En "Microbial Ecology of Foods". J.H. Silliker, R.P. Elliot, A.C. Baird Parker, F.L. Bryan, J.H. Christian, D.S. Clark, J.C. Olson y T.A. Roberts (eds.), págs. 470-520. Ed. Academic Press, New York.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 1999. High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/irrad.pdf [acceso: 14-10-13].

Opfer, C. 2008. Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.

Ordal, Z.J. 1962. Anaerobic packaging of fresh meat. En "Proceedings of Research Conference. American Meat Institute Foundation". Págs. 39-45. Chicago.

Orden de 5 de noviembre de 1981, por la que se aprueba la norma de calidad para lomo adobado de cerdo. **Boletín Oficial del Estado**, 9 de noviembre de 1981, número **268**, p. 26300.

Ordóñez, J.A.; Blanco, M. y de la Hoz, L. 1996. Envasado de la carne y pescado refrigerados en atmósferas modificadas para su distribución al detalle. Alimentación, Equipos y Tecnología. Junio, 35-40.

Ordóñez, J.A. 2013. Génesis y actividades del proyecto "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" (CARNISENUSA). En "Avances en la producción de elaborados cárnicos seguros y saludables". J.A. Ordóñez, F. Jiménez y J. Arnau. (eds.). Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries. Barcelona.

Ordóñez, J.A. y Ledward, D.A. 1977. Lipid and myoglobin oxidation in pork stored in oxygen- and carbón dioxide-enriched atmospheres. **Meat Science**. **1**: 41-48.

Ordóñez, J.A.; Cabeza, M.C.; de la Hoz, L. y Cambero, I. 2007. Uso de radiaciones beta para conseguir el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) en carne de pollo respecto a *Salmonella* spp. **Revista del Comité Científico de la AESAN**. **6**: 67-87.

Ordóñez, J.A.; Cambero M.I.; Fernández, L.; García M.L.; García de Fernando, G.; de la Hoz, L. y Selgas, M.D. 1998. Cambios *post mortem* del músculo. En "Tecnología de los Alimentos. Alimentos de origen animal". Págs. 170-184. Síntesis. Madrid.

Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., García, M.L. y Cabeza, M.C. 2011. Hazard of *Salmonella* in the intact shell egg and its possible removal from it. En "*Salmonella*: Classification, Genetics and Disease Outbreaks". S. Monte y P.E. de Santos (eds.). Nova Science Publishers, Inc. New York.

Ordóñez, J.A.; de Pablo, B.; Pérez de Castro, B.; Asensio, M.A. y Sanz, B. 1991. Selected chemical and microbiological changes in refrigerated pork stored in carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **39**: 668-672.

Osorio, J.F.; Ciro, J.V. y Mejía, L.G. 2005. Rheological and textural characterization of the Edam cheese. **Dyna**. **72**: 33-45. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/viewFile/750/1218>.

Owen, J.E. y Lawrie, R.A. 1975. The effect of an artificially induced high pH on the susceptibility of minced porcine muscle to undergo oxidative rancidity under frozen storage. **Journal of Food Technology**. **10**: 169-180.

Palumbo, S.A.; Jenkins, R.K.; Buchanan R.L. y Thayer D.W. 1986. Determination of irradiation D value for *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Food Protection**. **49**: 189-191.

Papadopoulos, L.S.; Miller, R.K.; Acuff, G.R.; Vanderzant, C. y Cross, H.R. 1991. Effect of sodium lactate on microbial and chemical composition of cooked beef during storage. **Journal of Food Science**. **56**: 341-347.

Paradis, C. y Adamounou, L.T. 1996. Qualités microbiologique et sensorielle de la chair d'omble de fontaine (*Savelinnius fontinalis*) irradiée et conservée à 1°C. **Sciences des Aliments**. **16**: 413-423.

Parekh, K.G. y Solberg, M. 1970. Comparative growth of *Clostridium perfringens* in carbon dioxide and nitrogen atmospheres. **Journal of Food Science**. **35**: 156-159.

Parrish, F.C.; Young, R.B.; Miner, B.E. y Anderson, L.D. 1973. Effect of *postmortem* conditions on certain chemical morphological and organoleptic properties of bovine muscle. **Journal of Food Science**. **38**: 690-695.

Partmann, W. y Keskin, S. 1979. Radiation-induced changes in the patterns of free ninhydrinreactive substances of meat. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**. **168**: 389-393.

Patterson, J.T. 1970. Hygiene in meat processing plants. 4. Hot-water washing of carcasses. Rec. Agric. Res. Ministry of Agriculture. N.I. 18: 85-87.

Patterson, M. 1988. Sensitivity of bacteria to irradiation on poultry meat under various atmospheres. **Letters in Applied Microbiology**. **7**: 55-58.

Patterson, M.F. 1989. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to irradiation on poultry meat and in phosphate buffered saline. **Letters in Applied Microbiology**. **8**: 181-184.

Patterson, R.L.S. 1975. The flavour of meat. En "Meat". D.J.A. Cole y R.A. Lawrie (eds.), págs. 359-379. Butterworths, London.

Pearson, A.M. 1976. En "Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos". J.F. Price y B.S. Schweigert (eds.). Ed. Acribia. Zaragoza.

Pedredo, F.D.L. y Pangborn, R.M. 1989. Evaluación sensorial de los alimentos: métodos analíticos. Págs. 231-232. Alhambra Mexicana. México.

Peleg, M. 1976. Texture analysis parameters obtained by an Instron universal testing machine. **Journal of Food Science**. **41**: 721-722.

Penny, I.F. 1984. Enzimología de la maduración. En "Avances de la Ciencia de la Carne". R. Lawrie (ed.), págs. 149-181. Ed. Acribia. Zaragoza.

Petran, R.L. y Swanson, K.M.J. 1993. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**. **56**: 616-618.

Pfieffer, N.E.; Field, R.A.; Varnel, T.R.; Kruggel, W.G. y Kaiser, I. 1972. Effects of *postmortem* aging and stretching on the macromolecular properties of collagen. **Journal of Food Science**. **37**: 897-900.

Philips, D.R. y Jakabova, M. 1977. Ca^{2+} dependent protease in human platelets. Specific cleavage of platelet polypeptides in the presence of added Ca^{2+} . **Journal of Biological Chemistry**. **252**: 5602-5605.

Pierson, M.D.; Collins-Thompson, D.L. y Ordal, Z.J. 1970. Microbiology, sensory and pigment changes of aerobically packaged beef. **Food Technology**. **24**: 1171-1175.

Pini, P.N. y Gilbert, R.J. 1988. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chicken and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**. **6**: 317-326.

Popovic, I.; Heron, B. y Covacin, C. 2014. *Listeria*: an Australian perspective (2001-2010). **Foodborne Pathogens and Disease**. **11**: 425 - 432.

Prändl, O.; Fischer, A.; Schmidhofer, T. y Sinell, H.J. 1994. Tecnología e higiene de la carne. Ed. Acribia, Zaragoza.

Price, J.F. y Schweigert, B.S. 1994. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Ed. Acribia, Zaragoza.

Primo Yúfera, E. 1997. Química de los alimentos. Ed. Síntesis S.A., Madrid.

Proctor, B.E. y Goldblith, S.A. 1951. Electromagnetic radiation fundamentals and their applications in food technology. **Advances in Food Research**. **3**: 119-196.

Purslow, P. 1985. The physical basis of meat texture: observations on the fracture behavior of cooked bovine M. *Semitendinosus*. **Meat Science**. **12**: 39-60.

Quinn, D.J.; Anderson, A.W. y Dyer, J.F. 1967. The inactivation of infection and intoxication micro-organisms by irradiation in seafood. En "Microbiological problems, in Food Preservation by irradiation". Págs. 1-13. International Atomic Energy Agency P1-199/9, Vienna.

Raffi, J.J.; Agnel, J.P.L.; Thierry, C.J.; Frejaville, C.M. y Saintlebe, L.R. 1981. Study of gamma-irradiated starches derived from different foodstuffs: a way for extrapolating wholesomeness data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **29**: 1227-1232.

Rahman, M. 1999. Irradiation preservation of foods. En "Handbook of food preservation". M. Rahman (ed.), págs. 397-419. Marcel Dekker A.G. New York.

Rahman, M. 2002. Manual de Conservación de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza.

Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. **Boletín Oficial del Estado**, 5 de abril de 2001, número **82**, pp. 12825-12830.

Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. **Boletín Oficial del Estado**, 20 de febrero de 2002, número **44**, pp. 6756-6799.

Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por la que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. **Boletín Oficial del Estado**, 18 de junio de 2014, número **147**, pp. 46058-46078.

Reddy, M.K.; Etlinger, J.D.; Rabinowitz, M.; Fischman, D.A. y Zak, R. 1975. Removal of Z-lines and alpha-actinin from isolated myofibrils by a calcium-activated neutral protease. **Journal of Biological Chemistry**. **250**: 4278-4284.

Reglamento (CE) número 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) número 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. **Diario Oficial de la Unión Europea**. **322**: 12-29.

Renner, M. y Labadie, J. 1993. Fresh red meat packaging and meat quality. En "Proceedings 39th international congress of meat science and technology". Págs. 361-387. Calgary.

Renwick, S.P. y Hansen, H.J. 1996. The RF line accelerator in in-line e-beam processing of beef and poultry. **Dairy food and environmental sanitation**. **16**: 214-221.

Riedo, F.X.; Pinner, R.W.; Tosca, M.L.; Cartter, M.L.; Graves, L.M.; Reeves, M.W.; Weaver, R.E.; Plikaytis, B.D. y Broome, C.V. 1994. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. **Journal of Infectious Diseases**. **170**: 693-696.

Riley, L.W.; Remis, R.S.; Helgerson, S.D.; McGee, H.B.; Wells, J.G.; Davis, B.R.; Hebert, R.J.; Olcott, E.S.; Johnson, L.M.; Hargrett, N.T.; Blake, P.A. y Cohen, M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. **New England Journal of Medicine**. **308**: 681-685.

Roberts, T. 1998. Cold pasteurization of foods by irradiation. En "Food Safety". 458-300. Págs. 1-12. Virginia Polytechnic and State University. Blacksburg.

Rocourt, J. 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. En "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. E.T. Ryser y E.H. Marth (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York.

Rocourt, J. y Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En "Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers". M.P. Doyle, L.R. Beuchet, y T.J. Montvile (eds.), pags. 337-352. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Rödel, W.H. y Krispien, K. 1977. Der Einfluss von Kühl und Gefriertemperaturen auf die Wasseraktivitaet (a_w -Wert) von Fleisch und Fleischer. **Fleischwirtschaft**, **10**: 1863.

Rojas, M. y Guerrero, L. 1998. Orientación alimentaria: glosario de términos. Fomento de nutrición y salud. En "Nutrición clínica y gastroenterología. 5". Págs. 16-19. Ed. Médica Panamericana. Bogotá.

Ronning, R.T.; Israelson E.L.; Lepp R.S.; Skaggs W.T. y Schoeder C.R. 1980. Final Report: Rat PER study, Raltech Scientific Services, St. Louis MO. (available from National Technical Information Service, Springfield, VA, PB84-187061).

Rosenow, E.M. y Marth, E.H. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35 °C. **Journal of Food Protection**. **50**: 452-459.

Ross, T.; Todd, E. y Smith, M. 2000. Exposure Assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Preliminary Report for Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods, Rome.

Rosset, R. 1982. Chilling, freezing and thawing. En "Meat microbiology". M.H. Brown (ed.), págs. 265-318. Applied Science Publishers. London.

Rossi, L.; Watson, D.; Escandarani, S.; Miranda, A. y Troncoso, A. 2009. La radiación a la mesa. **Revista chilena de infectología**. **26**: 318-330.

Roth, L.A. y Clark, D.S. 1972. Studies on the bacterial flora of vacuum-packaged fresh beef. **Canadian Journal of Microbiology**. **18**: 1761-1766.

Ryser, E.T. and Marth, E.H. 1988. Survival of *Listeria monocytogenes* in cold-pack cheese food during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**. **51**: 615-621.

Ryser, E.T.; Arimi, S.M. y Donnelly, C.W. 1997. Effect of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay, and grass silage. **Applied and Environmental Microbiology**. **63**: 3695-3697.

Salamina, G.; Dalle Donne, E.; Niccolini, A.; Poda, G.; Cesaroni, D.; Bucci, M.; Fini, R.; Maldini, M.; Schuchat, A.; Swaminthan, B.; Bibb, W.; Rocourt, J.; Binkin, N. y Salmaso, S. 1996. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiology and Infection**. **117**: 429-436.

Satin, M. 2002. Use of irradiation for microbial decontamination of meat: Situation and perspectives. **Meat Science**. **62**: 277-283.

Sato, K. y Hegarty, G.R. 1971. Warmed-over flavor in cooked meats. **Journal of Food Science**. **36**: 1198-1203.

Sato, K.; Hegarty, G.R. y Herring, H.K. 1973. The inhibition of warmed-over flavor in cooked meats. **Journal of Food Science**. **38**: 398-402.

Savage, G.P.; Dutta, P.C. y Rodriguez-Estrada, M.T. 2002. Cholesterol oxides: their occurrence and methods to prevent their generation in foods. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. **11**: 72-78.

Scallan, E.; Griffin, P.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V. y Hoekstra, R.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States unspecified agents. **Emerging Infectious Diseases**. **17**: 16-22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.P21101>

SCF (Scientific Committee for Food). 2003. Revision of the opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of food. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out193_en.pdf

Schlech, W.F.; Lavinge, P.M.; Bortolussi, R.A.; Allen, A.C.; Haldane, E.V.; Wort, A.J.; Hightower, A.W.; Johnson, S.E.; King, S.H.; Nicholls, E.S. y Broome, C.V. 1983. Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**. **308**: 203-206.

Schwartz, B. 1921. Effects of x-rays on trichinae. **Journal of Agricultural Research**. **20**: 845-854.

Schwartz, B.; Broome, C.V.; Brown, G.R.; Hightower, A.W.; Ciesielski, C.A.; Gaventa, S.; Gellin, B.C. y Mascola, L. 1988. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. **Lancet** **2**: 779-782.

Schwartz, W.W. y Bird, J.W.C. 1977. Degradation of myofibrillar proteins by cathepsin and cathepsin. **Biochemical Journal**. **167**: 811-820.

SCVPH (Scientific committee on veterinary measures relating to public health). 1999. Opinion on *Listeria monocytogenes*.

Segars, R.A.; Cardello, A.V. y Cohen, J.S. 1981. Objective and subjective texture evaluation of irradiation sterilized meat products. **Journal of Food Science**. **46**: 999-1003.

Seeliger, H.P.R. y Jones, D. 1986. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383 AL. En “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”. Vol. 2. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe y J.G. Holt (eds.), págs. 1235-1245. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.

Seideman S.C. y Durland J.P. 1983. Vacuum packaging of fresh beef: a review. **Journal of Food Quality**. **6**: 29-47.

Seideman, S.C.; Vanderzant, C.; Smith, G.C.; Hanna, M.O. y Carpenter, Z.L. 1976. Effect of degree of vacuum and length of storage on the microflora of vacuum packaged beef wholesale cuts. **Journal of Food Science**. **41**: 738-742.

Shahidi, F. 2002. Lipid derived flavours in meat products. En “Meat Processing: Improving Quality”. J. Kerry y D. Ledward (eds.), págs. 105-121. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.

Sheard, P.R.; Nute, G.R.; Richardson, R.I.; Perry, A. y Taylor, A.A. 1999. Injection of water and polyphosphate into pork to improve juiciness and tenderness after cooking. **Meat Science**. **51**: 371-376.

Sheard, P.R. y Tali, A. 2004. Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yield and tenderness of cooked pork loin. **Meat Science**. **68**: 305-311.

Sheridan, J.J.; Duffy, G.; McDowell, D.A. y Blair, I.S. 1994. The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. **International Journal of Food Microbiology**. **22**: 105-113.

Siegel, D.G. 2001. Case ready concepts- packaging technologies. National Meat Association Western Science Research Update Conference on Technologies for Improving the Quality and Safety of Case-Ready Products. Disponible en: <<http://www.meatscience.org/meetings/WSC/2001/default.htm>> Accessed 26.02.08

Sierra, I. 1973. Correlaciones entre diversos caracteres productivos en porcinos cruzados Blanco Belga x Landrace. Trabajos del I.E.P.G.E. 17: 1-43.

Sigurbjörnsson, B. y Loaharanu, P. 1989. Irradiation and food processing. **Bibliotheca Nutritio et Dieta**. **43**: 13-30.

Simard, R.E.; Lee, B.H.; Laleye, C.L. y Holley, R. 1985. Effects of temperature and storage time in the microflora, sensory and exudates changes of vacuum- or nitrogen-packed beef. **Canadian Institute of Food Science and Technology**. **18**: 126-132.

Simonetti, P.; Bersani, C.; D'Aubert, S. y Cantoni, C. 1983. Alterazione mefítica di prosciutti crudi da *Protus vulgaris*. **Industrie Alimentari**. **204**: 271-273.

Sindelar, J.J.; Prochaska, F.; Britt, J.; Smith G.L.; Millerr. K.; Templemanr, R. y Osburn W.N. 2003. Strategies to eliminate flavours and aromas in sow loins. I. Optimization of sodium tripolyphosphate, sodium bicarbonate, and injection level. **Meat Science**. **65**: 1211-1222.

Singh, H. 1988. Radiation preservation of low nitrite bacon. **Radiation Physics and Chemistry**. **31**: 165-179.

Singh, P.; Wani, A.A.; Saengerlaub, S. y Langowski, H.C. 2011. Understanding critical factors for the quality and shelf-life of MAP fresh meat. A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. **51**: 146-177.

Smart, J.L.; Roberts, T.A.; Stringer, M.F. y Shah, N. 1979. The incidence and serotypes of *Clostridium perfringens* on beef, pork and lamb carcasses. **Journal of Applied Microbiology**. **46**: 377-383.

Smith, L.A.; Simmons, S.L.; McKeith, F.K.; Bechtel, P.J. y Bradley, L. 1984. Effects of sodium tripolyphosphate on physical and sensory properties of beef and pork roasts. **Journal of Food Science**. **49**: 1636-1637.

Snyder, O.P. 1996. Use of time and temperature specifications for holding and storing food in retail food operations. **Dairy, food, and environmental sanitation**. **16**: 374-388.

Sommers, C.H.; Niemira, B.A.; Tunick, M. y Boyd, G. 2002. Effect of temperature on the radiation resistance of virulent *Yersinia enterocolitica*. **Meat Science**. **61**: 323-328.

Splittstoesser, D.F. 1976. Gram negative, non spore forming rods. En "Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects". M.P. Defigueiredo y D.F. Splittstoesser (eds.), págs. 312-334. Ed. AVI Publishing. Westport, C.T.

Stanley, G.; Shaw, K.J. y Egan, A.F. 1981. Volatile compounds associated with spoilage of vacuum-packaged sliced luncheon meat by *Brochothrix thermosphacta*. **Applied and Environmental Microbiology**. **41**: 816-818.

Steele, J.H. y Engel, R.E. 1992. Radiation processing of food. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. **201**: 1522-1529.

Stefanova, R.; Vasilev, N.V. y Spassov, S.L. 2010. Irradiation of food, current legislation framework, and detection of irradiated foods. **Food Analytical Methods**. **3**: 225-252.

Stegeman, H. 1988. Irradiation resistance of *Listeria monocytogenes*. Abstracts 10th International Symposium of Listeriosis. 22-26 august. Pecs. Hungary.

Steihauserova, I. 2000. Specific microflora of packed meat. **Czech Journal of Food Sciences**. **18**: 159-163.

Stetzer, A.J.; Novakofski, J.E. y Brewer, M.S. 2009. A research note: Effect of citric acid and/or rosemary extract on color of an irradiated beef myoglobin model system. **Journal of Muscle Foods**. **20**: 28-36.

Stewart, E.M. 2009. Effect of gamma irradiation on the quality of ready meals and their meat components. En "Irradiation to ensure the safety and quality of prepared meals".

Results of the Coordinated Research Project organised by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (2002-2006). Págs: 313-342. IAEA, Viena.

Stewart, E.M. 2010. Safety and quality of irradiated food. En “Processing Effects on Safety and Quality of Foods”. E. Ortega-Rivas (eds.), págs. 343-378. CRC Press, Taylor y Francis Group. Boca Raton, Florida.

Suárez, M.V.; Barba, C.; Forero, J.; Sereno, J.R.B.; Diéguez, E. y Delgado, J.V. 2002. Reproductive characterization of various pig breed from iberian origin. I. Descriptive analysis. **Archivos de Zootecnia**. **51**: 245-248.

Sutherland, J.P.; Patterson, J.T. y Murray, J.G. 1975. Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. **Journal of Applied Bacteriology**. **39**: 227-237.

Swaminathan, B. 2001. *Listeria monocytogenes*. En “Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd Edition”. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville (eds.), págs. 383-410. ASM Press, Washington.

Swaminathan, B.; Harmon M.C. y Mehlman, I.J. 1982. A review: *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Applied Bacteriology**. **52**: 151-183.

Swatland, H.J. 1991. Estructura y desarrollo de los animales de abasto. Ed. Acribia, Zaragoza.

Sweet, D.M. y Moseley, B.E.B. 1976. The resistance of *Micrococcus radiodurans* to killing and mutation by agents which damage DNA. **Mutation Research**. **34**: 175-186.

Synder, H.E. y Skrdlant, H.B. 1966. The influence of metallic ions on the autoxidation of oxymyoglobin. **Journal of Food Science**. **31**: 468-473.

Szczesniak, A.S. 1986. Sensory texture evaluation methodology. Reciprocal meat Conference Proceedings. 39: 86-96.

Szczesniak, A.S. 2002. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**. **13**: 215-225.

Tai C.Y.; Chen Y.C. y Chen B.H. 1999. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview. Part I. **Journal of Food and Drug Analysis**. **74**: 243-257.

Tamplin, M.L. 2002. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10 °C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. **Journal of Food Protection**. **65**: 1535-1540.

Tarkowski, J.A.; Stoffer, S.C.C.; Beumer, R.R. y Kampelmacher, E.H. 1984. Low dose gamma irradiation of raw meat. I. Bacteriological and sensory quality effects in artificially contaminated samples. **International Journal of Food Microbiology**. **1**: 13-23.

Taylor, A.A. 1972. Gases in fresh meat packaging. **Meat World**. **5**: 3-6.

Taylor, A.A. 1985. Packaging fresh meat. En "Developments in meat Science". R. Lawrie (ed.), pags. 89-113. Elsevier Applied Science. London.

Taylor, A.A. y McDougall, D.B. 1973. Fresh beef packed in mixtures of oxygen and carbon dioxide. **Journal of Food Technology**. **8**: 453-461.

Terrell, R.N. 1983. Reducing the sodium content of processed meats. **Food Technology**. **37**: 66-71.

Terry, A.J. y McColl, W.G. 1992. Radiological consequences of food irradiation. National Radiological Board. London.

Tewfik, I. y Tewfik, S. 2008. Would it still be possible to identify irradiated lipid-containing foods towards the end of their shelf-life. **Food Science and Technology International**. **14**: 519-524.

Thayer, D.W. 1987. Proceedings of the 8th International Congress of Radiation Research. Radiation Research. Edinburgh.

Thayer D.W.; Lachica, R.V.; Huhtanen, C.N. y Wierbicki, E. 1986. Use of irradiation to ensure the microbiological safety of processed meats. **Food Technology**. **46**: 159-162.

Thayer, D.W.; Songprasertchai, S. y Boyd, G. 1991. Effects of heat and ionizing radiation on *Salmonella typhimurium* in mechanically deboned chicken meat. **Journal of Food Protection**. **54**: 718- 724.

Thayer, D.W.; Boyd, G.; Fox, J.B.; Lakritz, L. y Hampson, J.W. 1995. Variations in radiation sensitivity of foodborne pathogens associated with the suspending meat. **Journal of Food Science**. **60**: 63-67.

Thayer, D.W. y Boyd, G. 1992. Gamma ray processing to destroy *Staphylococcus aureus* in mechanically deboned chicken meat. **Journal of Food Science**. **57**: 848-851.

Thayer, D.W. y Boyd, G. 1993. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. **Applied Environmental Microbiology**. **59**: 1030-1034.

Thayer, D.W.; Boyd, G.; Muller, W.S.; Lipson, C.A.; Hayne, W.C. y Baer, S.H. 1990. Radiation resistance of *Salmonella*. **Journal of Industrial Microbiology**. **5**: 383-390.

Thayer, D.W.; Christopher, J.P.; Campbell, L.A.; Ronning, D.C.; Dahlgren, R.R.; Thompson, G.M. y Wierbicki, E. 1987. Toxicology studies of irradiation-sterilized chicken. **Journal of Food Protection**. **50**: 278-288.

Thippareddi, H. y Phebus, R.K. 2007. Modified atmosphere packaging (MAP): Microbial control and quality. Pork Information Gateway Factsheet. 1-5.

Thippareddi, H.; Phebus, R.K.; Fung, D.Y.C. y Kastner, C.L. 1995. Use of universal pre-enrichment medium supplemented with oxydase for the simultaneous recovery of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Rapid Methods and Automated Microbiology**. **4**: 37-50.

Tims, M.J. y Watts, B.M. 1958. Protection of cooked meats with phosphates. **Food Technology**. **12**: 241-247.

Todar, K. 2006. Todar's online textbook of bacteriology. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology. Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net/>.

Toldrá, F.; Flores, M.; Aristoy, M.C.; Virgili, R. y Parolari, G. 1996. Pattern of muscle proteolytic and lipolytic enzymes from light and heavy pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. **71**: 124-128.

Tomkins, R.G. 1932. The inhibition of the growth of meat attacking fungi by carbon dioxide. **Journal of the Society of Chemical Industry**. **51**: 261-264.

Trout, G.R. 1988. Techniques for measuring water-holding capacity in muscle foods. A review of methodology. **Meat Science**. **23**: 235-252.

Tu, C.; Powrie, W.D. y Fennema, O. 1967. Free and sterified cholesterol content of animal muscles and meat products. **Journal of Food Science**. **42**: 30-34.

Tunick, M.H. 2000. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **Journal of Dairy Science**. **83**: 1892-1898.

Turin, L. y Warner, A. 1977. Carbon-dioxide reversible abolishes ionic communication between cells of early amphibian embryo. **Nature**. **270**: 56-57.

Urbain, W. M. 1986a. Food Irradiation. Academic Press Inc., Orlando, FL.

Urbain, W.M. 1986b. Food Irradiation. Food Science and Technology Monographs, Academic Press Inc., Orlando.

Urbain, W.M. 1989. Food Irradiation: The past fifty years as prologue to tomorrow. **Food Technology**. **43**: 76-92.

USDA/FSIS (United States Department of Agriculture -Food Safety and Inspection Service). 1993. Report on the Escherichia coli O157:H7 outbreak in the western states. U. S. Department of Agriculture, May 21, Washington, D.C.

USDA/FSIS (United States Department of Agriculture -Food Safety and Inspection Service). 1999. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. Capítulo 8. Microbiology Laboratory Guidebook. 3ª ed. Revision 2.

Uyttendaele, M.R.; Neyts, K.D.; Lips, R.M. y Debevere, J.M. 1997. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abattoirs. **Food Microbiology**. **14**: 339-345.

Variyar, P.S.; Chatterjee, S.; Sajilata, M.G.; Singhal, R.S. y Sharma, A. 2008. Natural existence of 2-alkylcyclobutanones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **56**: 11817-11823.

Venugopal, B. y Bailey, M.E. 1978. Lysosomal proteinases in muscle tissue and leukocytes of meat animals. **Meat Science**. **2**: 227-239.

Vitas, A.I.; Aguado, V. y García-Jalón, I. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). Short Communication. **International Journal of Food Microbiology**. **90**: 349-356.

Vote, D.J.; Platter, W.J.; Tatum, J.D.; Schmidt, G.R.; Belk, K.E. y Smith, G.C. 2000. Injection of beef strip loins with solutions containing sodium tripolyphosphate, sodium lactate, and sodium chloride to enhance palatability. **Journal of Animal Science**. **78**: 952-957.

Walker, S.J.; Archer, P. y Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**. **68**: 157-162.

Watts, M.E.; Whillans, D.W. y Adams, G.E. 1975. Studies of the mechanisms of radiosensitization of bacterial and mammalian cells by diamide. **International Journal of Radiation Biology**. **27**: 259-270.

Weir, C.E. 1960. Palatability characteristics of meat. En "Science of Meat and Meat Products. American Meat Institute Foundation". J.F. Price y B.S. Schweigert (eds.), págs. 212-221. W.H. Freeman. San Francisco.

Weiss, J. y Seeliger, H.P.R. 1975. Incidente of *Listeria monocytogenes* in nature. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **29**: 29-32.

Welshimer, H.J. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. **Journal of Bacteriology**. **80**: 316-320.

Whitburn, K.D.; Shieh, J.J.; Sellers, R.M.; Hoffman, M.Z. y Taub, I.A. 1982. Redox transformation in ferrimyoglobin induced by radiation-generated free radicals in aqueous solution. **Journal of Biological Chemistry**. **257**: 1860-1869.

WHO (World Health Organization). 1994. Safety and Nutritional Adequacy of Irradiated Food. Geneva.

WHO (World Health Organization). 1999. High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert, Committee. Geneva, World Health Organization, WHO Technical Report, Series, No. 890.

Windham, C.T.; Wyse, B.W. y Hansen, R.G. 1990. Thiamin, riboflavin, niacin and pantothenic acid. En "Meat and Health, Advanced Materials Research". Volume: 6. M. Pearson y T.R. Dutson (eds.), págs. 401-459. Elsevier Applied Science. London.

Wood, J.D.; Enser, M.; Whittington, F.M.; Moncrief, C.B. y Kempster, A.J. 1989. Backfat composition in pigs: differences between fat thickness groups and sexes. **Livestock Production Science**. **22**: 351-362.

Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R. y Enser, M. 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**. **66**: 21-32.

Wynveen, E.J.; Bowker, B.C.; Grant, A.L.; Lamkey, J.W.; Fennwald, K.J.; Henson, L. y Gerrard, D.E. 2001. Pork quality is affected by early *postmortem* phosphate and bicarbonate injection. **Journal of Food Science**. **66**: 886- 891.

Yang, H.S.; Lee, E.J.; Moon, S.H.; Paik, H.D.; Nam, K. y Ahn, D.U. 2011. Effect of garlic, onion, and their combination on the quality and sensory characteristics of irradiated raw ground beef. **Meat Science**. **89**: 202-208.

Yilmaz, I. y Gecgel, U. 2007. Effects of gamma irradiation on trans fatty acid composition in ground beef. **Food Control**. **18**: 635-638.

Yuste, J.; Mor-Mur, M.; Capellas, M. y Pla, R. 1999. *Listeria innocua* and aerobic mesophiles during chill storage of inoculated mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure. **Meat Science**. **53**: 251-257.

Zaika, L.L.; Kissinger, J.C. y Wasserman, A.E. 1983. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. **Journal of Food Science**. **48**: 1455-1459.

Zanardi, E.; Battaglia, A.; Ghidini, S.; Conter, M.; Badiani, A. y Ianieri, A. 2007. Evaluation of 2- alkylcyclobutanones in irradiated cured pork products during vacuum-packed storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **55**: 4264-4270.

Zhao, Y.; Wells, J.H. y McMillin, K.W. 1994. Applications of dynamic modified atmosphere packaing systems for fresh red meats: A review. **Journal of Muscle Foods**. **5**: 299-328.

Zhu, M.J.; Du, M.; Cordray, J. and Ahn, D.U. 2005b. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. Comprehensive Reviews in Food Science and **Food Safety**. **4**: 34-42.

Zhu, M.J.; Mendonca, A.; Ismail, H.A.; Du, M.; Lee, E.J. y Ahn, D.U. 2005a. Impact of antimicrobial ingredients and irradiation on the survival of *Listeria monocytogenes* and the quality of ready-to-eat turkey ham. **Poultry Science**. **84**: 613-620.